

Philipps



**Universität
Marburg**

**Untersuchung der Regulierung kleiner GTPasen
während des filamentösen Wachstums und der
Sekretion in *Ustilago maydis***

Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michaela Wehr

aus Heilbad Heiligenstadt

Marburg/Lahn, 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2010 bis April 2014 am Fachbereich Biologie, Abteilung Molekulare Genetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen

am: 12.09.2014

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Susanne Önel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2014

Teile dieser Arbeit werden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Wehr, M., Tillmann, B., Freitag, J., Lanver, D. and Bölker M.

The activation of the Rho-GTPase Rac1 by the untypical GEF Gds1 of *Ustilago maydis* is critical for filamentous growth (in Vorbereitung)

Wehr, M.*, Schink, K.O.* and Bölker, M.

Coordination of polarized secretion by the exocyst complex is critical for filamentous growth and cytokinesis in *Ustilago maydis* (in Vorbereitung)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Kleine GTPasen in Eukaryoten	5
1.1.1 Überblick	5
1.1.2 Regulation von GTPasen	7
1.2 Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren	8
1.2.1 Rho-GEFs	8
1.2.2 Der untypische GEF SmgGDS	9
1.3 Der Exozyst-Komplex	10
1.4 Der phytopathogene Pilz <i>Ustilago maydis</i>	12
1.4.1 Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	12
1.4.2 Signaltransduktion während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	14
1.4.3 Regulation des filamentösen Wachstums in <i>U. maydis</i>	16
1.5 Zielsetzung	19
2. Ergebnisse	21
2.1 Charakterisierung von Gds1	21
2.1.1 Bioinformatische Identifizierung von Gds1 (Um11926)	21
2.1.2 $\Delta gds1$ Mutanten zeigen einen Defekt im Kreuzungsverhalten und im filamentösen Wachstum	22
2.1.3 Gds1 wird für die pathogene Entwicklung benötigt	26
2.1.4 Lokalisierung von Gds1-GFP in hefeartigen und filamentösen Zellen	27

Inhaltsverzeichnis

2.2 Analyse von Gds1 während der pathogenen Entwicklung.....	28
2.2.1 Gds1 interagiert mit Komponenten der Signaltransduktionskaskade für die pathogene Entwicklung und mit kleinen GTPasen.....	28
2.2.2 Die Doppeldeletion von <i>gds1</i> und <i>msb2</i> bzw. <i>sho1</i> führt zu einer weiteren Reduzierung der Pathogenität und kann durch eine Deletion von <i>rok1</i> supprimiert werden.....	30
2.3 Gds1 wirkt als GEF in <i>U. maydis</i>	32
2.3.1 Gds1 kann Rac1 aktivieren.....	32
2.3.2 Gds1 benötigt die ersten 157 Aminosäuren von Rac1 für die spezifische Aktivierung.....	36
2.3.3 Gds1 ^{N600A R603A} kann Rac1 nicht mehr aktivieren.....	38
2.4 Die GEF-Aktivität von Gds1 ist wichtig für das filamentöse Wachstum.....	41
2.4.1 Die Überexpression von Gds1 hat keinen Einfluss auf die Zellmorphologie.....	41
2.4.2 Gds1 ^{N600A R603A} kann den verzögerten Filamentphänotyp einer $\Delta gds1$ Mutante nicht komplementieren.....	42
2.4.3 Die chimäre GTPase R118C zeigt ebenfalls einen reduzierten Filamentphänotyp.....	43
2.5 Analyse der Rho-GTPase interagierenden Exocyst-Komponenten Exo70 und Sec3.....	45
2.5.1 Untersuchung der Funktion von Exo70 in <i>U. maydis</i>	45
2.5.2 Sec3 interagiert mit der GDP-gebundenen Form der GTPase.....	48
2.5.3 Untersuchung der Lokalisation von Sec3 in unterschiedlichen <i>rac1</i> Mutanten.....	50
3. Diskussion.....	52
3.1 Gds1 ist ein spezifischer GEF für Rho-GTPasen und besitzt vermutlich einen neuartigen Wirkungsmechanismus.....	52
3.2 Gds1 spielt eine wichtige Rolle während des filamentösen Wachstums und benötigt dafür die GEF-Aktivität.....	57
3.3 Gds1 dient vermutlich als Gerüstprotein während der pathogenen Entwicklung.....	62
3.4 Exo70 besitzt vermutlich eine teilweise redundante Funktion zu Sec3.....	65
3.5 Das Zusammenspiel von Sec3 und Rac1 während des polaren Wachstums.....	68

4. Material und Methoden	71
4.1 Materialien und Bezugsquellen	71
4.1.1 Allgemeine Materialien	71
4.1.2 Kits	71
4.1.3 Chemikalien	71
4.1.4 Enzyme	74
4.1.5 Stämme	75
4.1.6 Plasmide und Primer	81
4.2 Methoden	93
4.2.1 Mikrobiologische Methoden	93
4.2.2 Molekularbiologische Methoden	101
4.2.3 Biochemische Methoden	108
5. Literaturverzeichnis	117
Abkürzungen	135
Danksagung	138
Lebenslauf	140
Eidesstattliche Erklärung	141

Abbildungsverzeichnis

1.1 Konformationsänderung der kleinen GTPase durch GTP/GDP Wechsel.....	6
1.2 Modell der Aktivierung und Deaktivierung von kleinen GTPasen.....	7
1.3 Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	13
1.4 Zusammenspiel des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Signalkaskade während der pathogenen Entwicklung in <i>U. maydis</i>	15
1.5 Modell der Rac1 Aktivierung und Inaktivierung an der Zellspitze.....	17
1.6 Der Exozyst-Komplex in <i>U. maydis</i>	18
2.1 Vergleichende Darstellung der Proteine SmgGDS aus <i>H. sapiens</i> , Gds1 aus <i>U. maydis</i> und Bem4p aus <i>S. cerevisiae</i>	21
2.2 Die Deletion von <i>gds1</i> führt zu einer Reduktion des Kreuzungsverhaltens und des filamentösen Wachstums.....	23
2.3 Die Deletion von <i>gds1</i> führt zu einem verzögerten Rac1-induzierten-Filament.....	25
2.4 Untersuchung der Deletion von <i>gds1</i> im haploiden Stammhintergrund (Bub8).....	26
2.5 Verminderte Virulenz von <i>gds1</i> Mutanten.....	27
2.6 Lokalisation von Gds1-GFP in <i>U. maydis</i>	28
2.7 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Interaktionsstudien von Gds1 mit verschiedenen GTPasen und Komponenten der Signaltransduktionskaskade für die pathogene Entwicklung.....	29
2.8 Die Doppeldeletion von <i>gds1</i> und <i>msb2</i> bzw. <i>sho1</i> weist eine deutlich verminderte Pathogenität auf. Diese kann durch $\Delta rok1$ supprimiert werden.....	31
2.9 Schematische Darstellung eines <i>in vitro</i> GEF-Assays.....	32
2.10 Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen von Gds1 und kleinen GTPasen aus <i>E. coli</i>	33
2.11 Gds1 ist ein Rac1 GEF.....	34
2.12 <i>In vitro</i> GEF-Assays von Gds1 mit Rho- und Ras-GTPasen.....	35

Abbildungsverzeichnis

2.13 Untersuchung der Rac1-Gds1 Interaktionsregion.....	37
2.14 Die Doppelmutation von N600A und R603A führt zum Verlust der GEF-Aktivität von Gds1.....	39
2.15 Überexpression von Gds1 bzw. GFP-Gds1-pbrCAAX _(rac1) zeigt keinen morphologischen Defekt.....	41
2.16 GEF Aktivität von Gds1 wird für das filamentöse Wachstum benötigt.....	43
2.17 Die Überexpression der chimären R118C GTPase zeigt im Vergleich zur Überexpression von Rac1 eine reduzierte Filamentbildung.....	44
2.18 Deletionsmutanten von <i>exo70</i> zeigen keine morphologischen Veränderungen während des knospenden und filamentösen Wachstums.....	46
2.19 Die Deletion von <i>exo70</i> hat keinen Effekt auf das Kreuzungsverhalten und die pathogene Entwicklung.....	47
2.20 Eine Reprimierung von <i>sec3</i> in einer <i>exo70</i> Deletionsmutante führt zu einem starken morphologischen Defekt.....	48
2.21 Sec3 zeigt die stärksten Interaktionen mit den GDP-beladenen Formen von Rac1 und Cdc42.....	49
2.22 Lokalisation von Sec3-3xGFP in verschiedenen <i>rac1</i> Mutanten.....	50
3.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der CAAX-Motive von Rho- und Ras-GTPasen aus <i>U. maydis</i>	54
3.2 Modellvorstellung des möglichen Wirkungsorts von Gds1 während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	65
3.3 Modellvorstellung des Rac1 Transports durch sekretorische Vesikel an die Spitze.....	70

Zusammenfassung

Kleine GTPasen der Rho-Familie dienen als molekulare Schalter an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel der Sekretion und dem polaren Wachstum. Dabei wechseln sie von einer inaktiven GDP-gebundenen zu einer aktiven GTP-gebundenen Konformation, in der sie mit Effektoren interagieren. Der Austausch von GDP zu GTP wird durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Neben den bekannten Rho-GEFs der Dbl- und Dock180-Familie gibt es einen weiteren, ungewöhnlichen GEF, SmgGDS, welcher aus einer Reihe von Armadillo-Wiederholungen besteht. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Funktion dieses in Säugern und Pilzen stark konservierten GEFs in einem pilzlichen Organismus untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Gds1 in dem phytopathogenen Pilz *U. maydis* als ein spezifischer Aktivator der kleinen GTPase Rac1 wirkt und an der Ausbildung des filamentösen Wachstum beteiligt ist. Biochemische Analysen zeigten, dass die Aktivierung von Rac1 durch Gds1 grundsätzlich auf eine andere Art und Weise erfolgt, als es von den GEFs der Dbl-Familie bekannt war. Diese unterscheiden zwischen den in ihrer Sequenz sehr ähnlichen GTPasen Rac1 und Cdc42 durch eine konservierte Aminosäure an Position 56. Gds1 benötigt dagegen für die Spezifitätsbestimmung die ersten 157 Aminosäuren von Rac1. Auf Seiten des GEFs konnte gezeigt werden, dass zwei konservierte Aminosäuren, Asparagin N600 und Arginin R603, eine wichtige Rolle für die katalytische Funktion von Gds1 spielen.

Neben dem filamentösen Wachstum, konnte für Gds1 auch eine Funktion während der pathogenen Entwicklung ermittelt werden, da eine Deletion von *gds1* zu einer reduzierten Virulenz führt. Zudem konnten Interaktionen von Gds1 mit mehreren Komponenten der pathogenen Entwicklung, wie beispielweise den Plasmamembranproteinen Msb2 und Sho1, der MAPKKK Kpp4 und dessen interagierendem Protein Ubc2, gezeigt werden. Es wird daher vermutet, dass Gds1 während der pathogenen Entwicklung als ein potentiell Gerüstprotein agiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mit dem Exozyst-Komplex ein Effektor kleiner GTPasen untersucht. Dieser aus 8 Proteinen bestehende Komplex ist in Pflanzen, Pilzen und Tieren sehr konserviert. Mit Hilfe der beiden Landmark-Proteine Sec3 und Exo70, die beide Teil des

Zusammenfassung

Komplexes sind, wird an der Plasmamembran der Ort für eine Exozytose markiert. Dabei wird die Lokalisation und Funktion der Landmark-Proteine unter anderem durch Interaktionen mit Rho-GTPasen reguliert. Gleichzeitig vermittelt der Exozyst-Komplex die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Ziellmembran. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Exo70 aus *U. maydis* um kein essentielles Landmark-Protein für die Exozytose handelt. Es erscheint aber wahrscheinlich, dass Exo70 vermutlich eine teilweise redundante Funktion zu Sec3 besitzt. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Sec3 aus *U. maydis* im Gegensatz zu den Varianten anderer Organismen nicht mit der aktiven Form der Rac1 GTPase sondern bevorzugt mit der GDP-gebundenen Form interagiert. Nähere Untersuchungen des Zusammenspiels von Sec3 und der interagierenden GTPase Rac1 während des polaren Wachstums haben ergeben, dass die Lokalisation von Sec3 unabhängig von Rac1 ist.

Summary

Small GTPases of the Rho-family play crucial roles during several cellular processes, e.g. polar growth and secretion. The conformation of these GTPases can change between GDP- and GTP-bound forms resulting in inactive and active enzymes, respectively. The active GTPases are able to interact with a variety of effectors and exchange of GDP and GTP is catalyzed by guanine nucleotide exchange factors (GEF). One unusual GEF is represented by SmgGDS which is neither belonging to the Dbl- nor the Dock180-family of Rho-GEFs. This GEF contains a series of armadillo repeats and is highly conserved within mammals and fungi. This study of Gds1, the SmgGDS homolog in *Ustilago maydis*, is the first characterization of this GEF in fungi and shows the specific activation of the small GTPase Rac1. Through this interaction, Gds1 also plays a role for the filamentous growth of the phytopathogenic organism *U. maydis*. The biochemical analysis conducted during this study show that the activation of Rac1 by Gds1 is facilitated in a different manner compared to the GEFs of the Dbl-family. While the members of the Dbl-family employ a specific amino acid residue at position 56 to distinguish between Rac1 and Cdc42, specific recognition by Gds1 is dependent on the first 157 residues of Rac1. The GEF itself uses the two conserved residues asparagine N600 and arginine R603 for its catalytic function.

Gds1, however, also showed an influence on the pathogenicity as a deletion of *gds1* resulted in a reduced virulence. Interactions of Gds1 with the membrane proteins Msb2 and Sho1, the MAPKKK Kpp4 and Ubc2, all components of the pathogenic pathways in *U. maydis*, further show the influence on the pathogenicity. Therefore, it can be assumed that Gds1 might be a potential scaffold protein.

Another part of this study focused on the exocyst complex. This amongst plants, animals and fungi highly conserved effector of small GTPases is formed by eight components. The two landmark proteins Sec3 and Exo70, components of the complex, mark the location for exocytosis. The localization and function of the two proteins is partially regulated by interactions with Rho-GTPases. After localization to the membrane, the exocyst complex enables a successful fusion of secretory vesicles. While Exo70 plays an important role as a landmark protein in *Saccharomyces cerevisiae*, no similar function was identified for the

Summary

homolog of *U. maydis*, which was characterized within this study. Yet a partially functional redundancy to Sec3 cannot be excluded. Interestingly, it was shown that Sec3 of *U. maydis* interacts with the inactive GDP-bound form of Rac1 and not with the active GTP-bound conformation as it was shown for the Sec3 homologs of other organisms. Detailed analysis of the interplay of Rac1 and Sec3 during polar growth of *U. maydis* revealed that Sec3 localization is independent of Rac1.

1. Einleitung

1.1 Kleine GTPasen in Eukaryoten

1.1.1 Überblick

Damit eine Zelle überlebensfähig ist, müssen viele komplexe Signalkaskaden, die durch endogene und exogene Reize stimuliert werden, koordiniert nebeneinander ablaufen. Essentielle Regulatoren sind dabei GTP-bindende Proteine (G-Proteine), die als molekulare Schalter wirken. Die G-Proteine können in zwei große Klassen eingeteilt werden. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β und γ), die einen Komplex mit Rezeptorproteinen eingehen können und dadurch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion übernehmen (Bourne, 1997). Die zweite Klasse der G-Proteine sind kleine, monomere GTP-bindende Proteine. Bisher sind mehr als 100 Mitglieder dieser kleinen GTPasen bekannt, die aufgrund ihrer zellulären Funktionen in 5 Familien unterteilt werden: die Ras-, Rho-, Rab-, Ran- und Sar1/Arf-ähnlichen (Takai et al, 2001). Kleine GTPasen der Ras-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression, während die Rho-ähnlichen Proteine hauptsächlich die Organisation des Aktinzytoskeletts regulieren (Takai et al, 2001).

Kleine GTPasen können zwischen der GDP-gebundenen inaktiven und der GTP-gebundenen aktiven Form wechseln. Die damit einhergehende Konformationsänderung begünstigt die Interaktion mit den jeweiligen Effektoren (Bourne et al, 1990). Kristallstrukturen von GDP-gebundenen und GTP-gebundenen GTPasen konnten zeigen, dass die Konformationsänderung durch zwei flexible Regionen, der Switch I- und Switch II-Region, ermöglicht wird (Abb. 1.1 A) (Milburn et al, 1990). Bindet GTP über die Phosphatbindeschleife (P-Loop) mit der GTPase, bilden ein Theronin in der Switch I-Region und ein Glycin in der Switch II-Region Wasserstoffbrücken zu γ -Phosphatgruppe des GTP aus (Abb. 1.1 B) (Vetter & Wittinghofer, 2001). Nach der erfolgten GTP-Hydrolyse und dem Verlust der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zu einer Konformationsänderung. Zusätzlich benötigen kleine GTPase für einen Ladeaustausch und

1. Einleitung

eine erhöhte Affinität zu Guanin-Nukleotiden den Kofaktor Magnesium (Vetter & Wittinghofer, 2001). Gezielte Mutationen, z. B. in der Switch II-Region, können den GTPase-Zyklus stören und konstitutiv aktive bzw. inaktive GTPasen erzeugen. So führt der Austausch von einem konservierten Glutamin an der Position 61 zu einem Leucin zum Verlust der GTPase-Aktivität, was wiederum in einem konstitutiv aktivem Protein resultiert (Ziman et al, 1991). Ein Austausch von Theronin an Position 17 zu Asparagin hingegen führt zu einer Inhibierung des Wechsels zwischen GDP und GTP. Dies resultiert letztendlich in einer dominant negativen GTPase (Feig & Cooper, 1988).

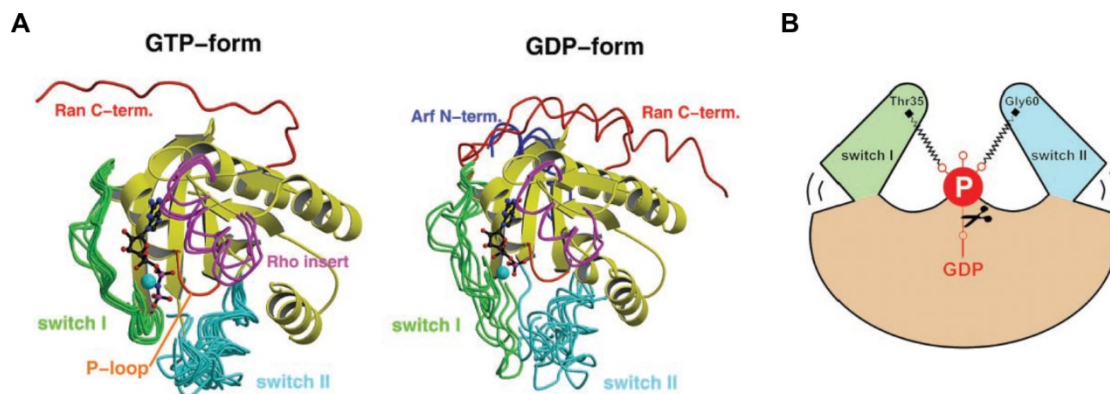


Abbildung 1.1: Konformationsänderung der kleinen GTPase durch GTP/GDP Wechsel.

(A) Dargestellt ist eine Überlagerung dreidimensionaler Strukturen von mehreren verschiedenen kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie im GDP- bzw. GTP-gebundenen Zustand. Die Switch I- und Switch II-Region (grün bzw. blau) verändern ihre Lage in Abhängigkeit des gebundenen Guanin-Nukleotids. Zudem sind die Rho-Insertionsdomäne (lila), der N-Terminus von Arf (dunkelblau) und der C-Terminus von Ran (rot) abgebildet. (B) Schematische Darstellung einer aktiven GTPase. Die Switch I und Switch II-Regionen gehen über ein invariantes Theronin-35 und Glycin-60 Wasserstoffbrückenbindungen zu dem γ -Phosphat des GTPs ein. Nach der GTP-Hydrolyse kommt es wegen der fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen zu einem relaxieren der Switch-Regionen, was zu einer Konformationsänderung führt (Vetter & Wittinghofer, 2001).

Neben den beiden Switch-Regionen besitzen einige kleine GTPasen am C-Terminus zusätzlich ein CAAX-Motiv (C=Cystein, A=aliphatische Aminosäure, X=beliebige Aminosäure). Dieses Motiv fungiert als Signal für eine posttranslationale Lipidmodifikation und ermöglicht es der GTPase auf diese Weise an die Membran rekrutiert zu werden (Adamson et al, 1992a; Adamson et al, 1992b). Die Art der jeweiligen Lipidmodifikation hängt insbesondere von der vierten Aminosäure des CAAX-Motives ab. Handelt es sich um ein Methionin, Serin oder Alanin findet bevorzugt eine Farnesylierung statt, während bei einem Leucin die GTPase geranyliert-geranyliert wird (Casey et al, 1991; Hartman et al, 2005; Yokoyama et al, 1991). Nach erfolgter Prenylierung des Cysteins durch Farnesyltransferasen oder Geranylgeranyltransferasen, werden die drei C-terminalen Aminosäuren (AAX) durch

1. Einleitung

die Protease Rce1 abgespalten. Anschließend erfolgt eine durch eine Methyltransferase (Icmt) katalysierte Methylierung des Cysteins (Bergo et al, 2000; Kim et al, 1999). Zusätzlich zum CAAX-Motiv besitzen einige kleine GTPasen am C-Terminus noch eine polybasische Region (PBR), die ein weiteres Signal für die Lokalisation an Membranen ist. Diese Regionen sind mit Arginin und Lysin Resten angereichert und erlauben es der GTPase durch elektrostatische Interaktionen zwischen den positiv geladenen Aminosäuren und den negativ geladenen Phosphatköpfen der Phospholipide innerhalb der Membran, an diese zu binden. Zudem ermöglicht diese Region auch Interaktionen mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel dem GEF SmgGDS (Abschnitt 1.2.2) (Adamson et al, 1992b; Hamel et al, 2011; Jack et al, 2008; Williams, 2003).

1.1.2 Regulation von GTPasen

Im allgemeinen werden kleine GTPasen durch zwei Klassen von Regulator-Proteinen beeinflusst. Eine dieser Klassen wird durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) dargestellt, die für die Aktivierung der GTPase benötigt werden. GEFs binden an die GDP-gebundene Form der GTPase und katalysieren die Freisetzung von GDP und Magnesium. Zusätzlich stabilisiert der GEF die nukleotidfreie GTPase und erlaubt dadurch die Aufnahme von GTP (Bourne et al, 1990; West et al, 1990). Die Inaktivierung der GTPase erfolgt durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs), welche die Hydrolyse von GTP zu GDP und anorganischen Phosphat (P_i) unterstützen. Dabei interagiert der GAP mit der GTPase und stimuliert die schwache intrinsische GTPase-Aktivität (Bourne et al, 1990; Bourne et al, 1991; Cales et al, 1988).

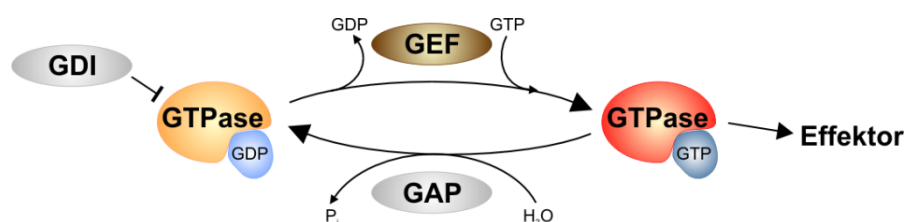


Abbildung 1.2: Modell der Aktivierung und Deaktivierung von kleinen GTPasen. Kleine GTPasen können von einer inaktiven GDP-gebundenen Form (orange) zu einer aktiven GTP-gebundenen Form (rot) wechseln. Den Austausch von GDP zu GTP wird von den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Die aktive Konformation ermöglicht es den GTPasen mit Effektor-Proteinen zu interagieren und diese zu aktivieren. Eine Inaktivierung der GTPasen erfolgt durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren. In der GDP-gebundenen Form können Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) die GTPase aus der Membran herauslösen und im Zytoplasma halten.

1. Einleitung

Mit den Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) werden die Rho- und Rab-GTPasen zusätzlich von einer weiteren Klasse von Regulatorproteinen beeinflusst. GDIs besitzen eine hydrophobe Bindetasche, durch die sie an die C-terminale Lipidmodifikation der GTPase binden und die GTPase aus der Membran herauslösen können (Michaelson et al, 2001; Sasaki et al, 1990; Seabra & Wasmeier, 2004; Wu et al, 1996b). GDIs halten die GDP-gebundene GTPase solange im Zytoplasma bis sie durch einen GDI-Dissoziationsfaktor, wie z. B. ERM, gehemmt werden (Takahashi et al, 1997). Die Interaktion mit GDIs wird in Rho-GTPasen durch eine zusätzliche Rho-Insertionsdomäne ermöglicht. Diese Domäne kann gleichzeitig zur Bindung einiger Effektoren dienen (Valencia et al, 1991; Wu et al, 1997b).

Neben der Wechselwirkung mit regulatorischen Proteinen, spielt auch die Lokalisation eine wichtige Rolle in der Regulation der Funktion von GTPasen. So kann eine räumliche Regulation beispielsweise über die PBR und die Prenylierung des CAAX-Motivs erfolgen (Abschnitt 1.1.1) (Glomset & Farnsworth, 1994; Williams, 2003; Zhang & Casey, 1996).

1.2 Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren

1.2.1 Rho-GEFs

GEFs sind Proteine, die den Nukleotid-Austausch von kleinen GTPasen katalysieren können. Der erste identifizierte GEF für Rho-GTPasen war Dbl, der aus Diffusen B-Zellen Lymphom isoliert wurde und die GTPase Cdc42 aktiviert (Eva & Aaronson, 1985; Hart et al, 1991). Dbl ist der Begründer der Dbl-Familie der Rho-GEFs. Charakteristisch für diese GEF-Familie ist ein Tandem-Motiv aus der katalytischen Dbl-Homologie Domäne (DH) und einer lipidinteragierenden Pleckstrin Homologie Domäne (PH) (Schmidt & Hall, 2002). Für die Katalyse des Nukleotid-Austausches erfolgt eine Interaktion der DH-Domäne mit den Switch-Regionen der GTPase. Das führt zu einer Strukturänderung der Nukleotidbindetasche. Diese Konformationsänderung führt zur Blockade der Magnesium koordinierenden Region, wodurch das über Magnesium komplexierte GDP verdrängt wird. Der erfolgte Strukturwechsel ist reversibel und wird durch die Aufnahme von GTP mit Magnesium umgekehrt (Rossman et al, 2005). Die PH-Domäne scheint auch eine Rolle während der Regulation des Nukleotid-Austausches zu spielen (Erickson & Cerione, 2004; Snyder et al, 2001). PH-Domänen interagieren mit Phosphatidyl-Inositol-Phosphaten, was die Lokalisation und Verankerung des GEFs an die Membran bewirkt und zu einer korrekten Positionierung der DH-Domäne zur GTPase hinführt (Ferguson et al, 1995; Rossman et al, 2005). Einige

1. Einleitung

GEFs der Dbl-Familie, wie z.B. TUBA besitzen anstatt der PH-Domäne eine Bin-Amphiphysine-Rvs (BAR)-Domäne, die spezifische Membrankrümmungen erkennt und an diese bindet (Salazar et al, 2003).

Eine weitere Familie der Rho-GEFs sind die Dock180-Proteine (Hasegawa et al, 1996; Takai et al, 1996). Für GEFs der Dock180-Familie sind die zwei DOCK-Homologie Regionen DHR1 und DHR2 sehr charakteristisch. Dabei fungiert DHR2 als katalytische Einheit (Cote & Vuori, 2002). Hinzu kommt, dass GEFs der Dock180-Familie einen nahezu identischen Nukleotid-Austausch-Mechanismus wie die GEFs, der Dbl-Familie besitzen.

Neben den GEFs der Dbl- und Dock180-Familie gibt es auch noch den untypischen GEF Smg-Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Stimulator (GDS) (Isomura et al, 1990). Dieser GEF besitzt im Vergleich zu den GEFs der Dbl- und Dock180-Familie einen anderen Mechanismus in Bezug auf die Interaktion und Aktivierung von Rho-GTPasen (Hamel et al, 2011).

1.2.2 Der untypische GEF SmgGDS

Der ungewöhnliche GEF, SmgGDS, wurde erstmals aus Rinderhirnzellen isoliert und weist eine Reihe von sogenannten Armadillo-Wiederholungen (ARM) auf (Isomura et al, 1990; Peifer et al, 1994; Yamamoto et al, 1990). ARM-Wiederholungen sind ca. 42 Aminosäuren lange Motive, welche drei α -Helices bilden und erstmals im *Drosophila* Polaritäts-Protein Armadillo (Homolog von β -Catenin) identifiziert wurden und dadurch ihren Namen erhalten haben (Peifer et al, 1994; Riggleman et al, 1989). Durch die Wiederholungen der ARM-Motive kann sich eine Superhelix ausbilden, die als Interaktionsfläche für andere Proteine dient und den ARM-haltigen Proteinen zudem ermöglicht, mehrere Funktionen innerhalb der Zelle einzunehmen (Tewari et al, 2010). SmgGDS existiert in zwei Isoformen, von denen die längere (SmgGDS-607) 14 ARM-Wiederholungen besitzt, während die kürzere Isoform (SmgGDS-558) nur 13 ARM-Wiederholung aufweist. Die ARM-Wiederholungen von SmgGDS formen eine helikale Bindungsfurche im C-terminalen Bereich, die zusammen mit der hoch konservierten elektronegativen Region im Zentrum von SmgGDS für die Interaktion mit GTPasen wichtig ist (Hamel et al, 2011).

SmgGDS wurde sowohl als Aktivator für Ras-GTPasen (Rap1A, Rap1B, K-Ras) als auch für Rho-GTPasen (Rac1, Rac2, Cdc42, RhoA und RhoB) beschrieben (Chuang et al, 1994; Hiraoka et al, 1992; Isomura et al, 1990; Mizuno et al, 1991; Yaku et al, 1994; Yamamoto et al, 1990). Neuere Studien zeigen allerdings, dass SmgGDS nur die Rho-GTPasen RhoA und

1. Einleitung

RhoC aktiviert (Hamel et al, 2011). Für diese Interaktion benötigt SmgGDS die polybasische Region der GTPasen (Hamel et al, 2011; Lanning et al, 2003; Vikis et al, 2002; Williams, 2003). Auf Seiten von SmgGDS konnten konservierte saure Aminosäuren in der elektronegativen Region und polare Aminosäuren in der helikalen Bindungsfurche identifiziert werden, die eine wichtige Rolle für die Bindung an RhoA spielen. Diese Beobachtungen führen zur Hypothese, dass sich die GTPase in die helikale Bindungsfurche von SmgGDS legt und die PBR der GTPase eine elektrostatische Interaktion mit der elektronegativen Region von SmgGDS eingeht (Hamel et al, 2011). Obwohl *in vitro* beide Isoformen den Nukleotid-Austausch von RhoA und RhoC katalysieren konnten, kann nur die kleinere Isoform SmgGDS-558 diesen auch *in vivo* aktivieren (Hamel et al, 2011). Die Aktivierung von Rho-GTPasen durch SmgGDS-558 spielt bei vielen Krebserkrankungen, wie z.B. Brust-, Prostata-, Bauspeicheldrüsen-, und Lungenkrebs eine entscheidende Rolle (Hauser et al, 2014; Schuld et al, 2014a; Zhi et al, 2009).

Beide Isoformen von SmgGDS sind zudem an der Prenylierung und der Lokalisation von GTPasen an die Membran beteiligt (Berg et al, 2010; Schuld et al, 2014b). Dabei bindet SmgGDS-607 bevorzugt an GTPasen, die geranyliert-geranyliert werden und somit an der vierten Position des CAAX-Motivs ein Leucin besitzen (CAAL). Es wird angenommen, dass SmgGDS-607 an der Einleitung der Prenylierung von GTPasen involviert ist und womöglich einen Komplex mit der Geranylgeranyltransferase eingeht (Schuld et al, 2014b). Nach der Prenylierung der GTPase bindet SmgGDS-558 an die modifizierte GTPase und vermittelt den Transport an die Plasmamembran (Berg et al, 2010).

Obwohl SmgGDS sowohl in Tieren als auch in Pilzen sehr hoch konserviert ist, gibt es bisher keine Untersuchungen zur Funktion von SmgGDS in pilzlichen Organismen. Studien in *S. pombe* zeigten lediglich, dass das Zinkfinger-Protein Zfs1 an die untranslatierte 3'-mRNA von *arz1* (dem SmgGDS Homolog) bindet und dadurch den Abbau der *arz1* mRNA vermittelt (Cuthbertson et al, 2008).

1.3 Der Exozyst-Komplex

Damit Pilzzellen ihre Polarität aufrechterhalten können, ist es wichtig, dass eine gerichtete Sekretion stattfindet, bei der sekretorische Vesikel mit Zellwandmaterial und Proteinen an die Spitze gebracht werden. Dieser Transportprozess wird durch den Exozyst-Komplex reguliert, der die Stellen der Exozytose markiert. Zudem vermittelt der Exozyst-Komplex die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran (He & Guo, 2009; Lipschutz & Mostov, 2002). Der Exozyst-

1. Einleitung

Komplex besteht aus 8 konservierten Komponenten: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 und Exo84, die erstmals in *S. cerevisiae* beschrieben wurden (Guo et al, 1999a; TerBush et al, 1996; TerBush & Novick, 1995). Obwohl die Komponenten keine Sequenzhomologie zueinander besitzen, weisen sie dennoch eine ähnliche Kristallstruktur auf (Croteau et al, 2009). Diese aus mehreren langgestreckten helikalen Bündeln bestehende Struktur dient vermutlich zur Interaktion der Komponenten (Croteau et al, 2009; Munson & Novick, 2006). Der Exozyst-Komplex wird unter anderem durch kleine GTPasen reguliert (Wu et al, 2008). Auf Seiten der sekretorischen Vesikel konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die aktive Rab-GTPase Sec4p mit der Exozyst-Komponente Sec15p interagiert (Guo et al, 1999b). Über diese Interaktion wird die Bindung der Vesikel an den Komplex gesteuert (Salminen & Novick, 1989). In höheren Zellen übernehmen die Rab-GTPasen Rab8 und Rab11 diese Funktion (Stenmark, 2009). An der Plasmamembran werden die zwei Landmark-Proteine Sec3p und Exo70p von den Rho-GTPasen Cdc42p, Rho1p und Rho3p reguliert (Guo et al, 2001; Robinson et al, 1999; Wu et al, 2010; Zhang et al, 2001). Dabei sind die Rho-GTPasen sowohl an der Lokalisation als auch an der Aktivierung der beiden Proteine beteiligt. Es wird angenommen, dass es durch die Interaktion der aktiven Rho-GTPase mit der Exozyst-Komponente (Sec3 oder Exo70) zu einer Konformationsänderung kommt, wodurch das Andocken der sekretorischen Vesikel ermöglicht wird (Wu et al, 2008). Die Interaktion von Sec3p mit den GTPasen erfolgt dabei über den N-terminalen Bereich, wohingegen der C-Terminus mit Sec5p interagiert (Guo et al, 2001; Zhang et al, 2001). Der N-Terminus von Sec3p besteht aus einer *pleckstrin homology* (PH) Domäne. Diese ermöglichen neben der Interaktion mit den GTPasen auch die Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Baek et al, 2010; Yamashita et al, 2010; Zhang et al, 2008). Eine *sec3ΔN* Mutante führt in *S. cerevisiae* zwar zu einer Delokalisation von Sec3p, trotzdem weisen die Zellen keinen Wachstums bzw. Sekretionsdefekt auf (Guo et al, 2001). Nur in Kombination mit einer *exo70* Mutante, die nicht mehr an die Plasmamembran binden kann, führt *sec3ΔN* zu starken Defekten bis hin zur Letalität der Zelle, was auf eine redundante Funktion von Sec3p und Exo70p hindeutet (He et al, 2007a; He et al, 2007b). In *S. pombe* besitzen Sec3 und Exo70 ebenfalls redundante Funktionen für die Lokalisation des Exozyst-Komplexes und benötigen dafür die Interaktion mit den Rho-GTPasen und PIP₂ (Bendezu et al, 2012).

Während Sec3p und Exo70p in *S. cerevisiae* den Ort der Exozytose markieren, binden die übrigen 6 Komponenten des Exozyst-Komplexes über Interaktionen von Sec15p und Sec4p

1. Einleitung

an die sekretorischen Vesikel. Diese werden mit Hilfe des Motorproteins Myo2p entlang von Aktinfilamenten zur Spitze transportiert (Pruyne et al, 1998). Dabei interagieren sowohl Sec4p als auch Sec15p mit Myo2p (Jin et al, 2011). An der Zielmembran binden die Exozyst-Komponenten an den Landmark-Komplex aus Sec3 und Exo70 und positionieren auf diese Weise die Vesikel in der Nähe der Membran. Das t-SNARE Protein Sec9p auf der Plasmamembran kann nun mit den beiden v-SNAREs Snc1p und Snc2p auf den sekretorischen Vesikeln interagieren und dadurch die Fusion von Vesikel und Membran vermitteln (Brennwald et al, 1994; Couve & Gerst, 1994). Der Exozyst-Komplex interagiert über Sec6p ebenfalls mit dem t-SNARE Sec9p und kann dadurch inhibierend auf Sec9p wirken (Morgera et al, 2012; Sivaram et al, 2005).

Neben seiner Funktion bei der gerichteten Sekretion spielt der Exozyst-Komplex in Säugern auch in weiteren Prozessen eine Rolle, wie z.B. bei der Zellmigration, der Ciliogenese und der Autophagozytose (Bodemann et al, 2011; Das & Guo, 2011; Hertzog & Chavrier, 2011; Liu & Guo, 2012).

1.4 Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis*

1.4.1 Lebenszyklus von *U. maydis*

Ustilago maydis ist ein phytopathogener Pilz, der zur Ordnung der Brandpilze gehört. Während seines dimorphen Lebenszyklus durchläuft *U. maydis* sowohl eine nicht-pathogene haploide Form als auch eine pathogene dikaryotische Form (Abb. 1.3). Haploide Zellen vermehren sich asexuell durch bipolare Knospung. Dabei werden zwei aufeinanderfolgende Septen gebildet, wodurch eine Fragmentierungszone entsteht, an der die Zelltrennung stattfindet (Banuett & Herskowitz, 2002; Weinzierl et al, 2002). Der Übergang zur dikaryotischen Form erfolgt durch das Aufeinandertreffen von zwei Sporidien welche sich in ihren Kreuzungstyploci, dem biallelischen *a*-Lokus und einem multiallelischen *b*-Lokus, unterscheiden (Banuett & Herskowitz, 1989). Der Kreuzungstyplokus *a* kodiert für ein Pheromon/Rezeptor-System (*mfa/pa*), welches für die Zell/Zellerkennung und die Fusion benötigt wird (Bölker et al, 1992). Erkennt der Pheromonrezeptor das Pheromon kompatibler Sporidien, resultiert dies in einem Zellzyklusarrest und es kommt zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und an der Spitze fusionieren (Bölker et al, 1992; Snetselaar et al, 1996; Spellig et al, 1994b). Die Ausbildung des daraus entstehenden dikaryotischen Filaments wird vom multiallelischen *b*-Lokus reguliert, der für die beiden Homeodomänen-Proteine bEast (bE) und bWest (bE)

1. Einleitung

kodiert (Brachmann et al, 2001; Gillissen et al, 1992). Diese können, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen, dimerisieren und dadurch einen funktionellen Transkriptionsfaktor bilden, der das filamentöse Wachstum und die pathogene Entwicklung einleitet (Gillissen et al, 1992; Kämper et al, 1995; Schulz et al, 1990; Yee & Kronstad, 1993).

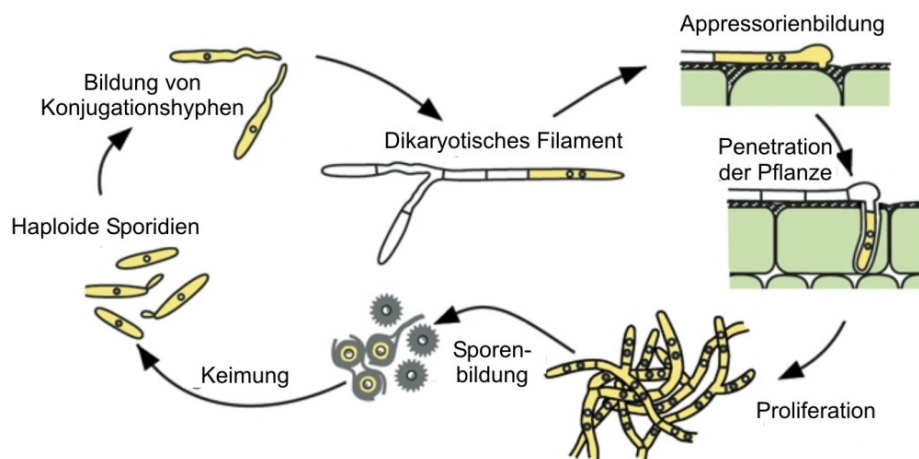


Abbildung 1.3: Lebenszyklus von *U. maydis*. Der phytopathogene Pilz *U. maydis* durchläuft einen dimorphen Lebenszyklus. Treffen zwei kompatible haploide Sporidien aufeinander, erfolgt eine Ausbildung von Konjugationshyphen, die durch einen Pheromongradienten zueinander hin wachsen. Nach der Fusion wird ein dikaryotisches Filament ausgebildet, welches durch Appressorienbildung die Pflanze penetrieren kann. In der Pflanze induziert *U. maydis* die Bildung von Gallen, in denen die Proliferation und anschließende Sporenbildung stattfindet. Nach aufplatzen der Gallen können die Sporen durch Wind, Regen oder Tiere verbreitet werden, auskeimen und es können neue haploide Sporidien entstehen (Kämper et al, 2006).

Das pathogene dikaryotische Filament verlängert sich durch ein apikales Spitzenwachstum und zieht an der Filamentbasis Septen ein, wodurch der zytoplasmatische Teil gegen den entleerten Abschnitt abgegrenzt wird (Banuett & Herskowitz, 1994). Auf der Blattoberfläche wird durch die Hydrophobizität der Cuticular und die Wahrnehmung von Cutinmonomeren die Ausbildung von Appressorien an der Zellspitze stimuliert (Mendoza-Mendoza et al, 2009). Zusammen mit sekretierten lytischen Enzymen ermöglichen die Appressorien ein Eindringen des Pilzes in die Pflanze (Doehleemann et al, 2008; Schirawski et al, 2005). Innerhalb der Pflanze wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und es findet zunächst eine intrazelluläre Proliferation der Hyphen statt und wodurch diese in die Zellschicht des Mesophylls wachsen (Banuett & Herskowitz, 1996). Anschließend induziert *U. maydis* die Ausbildung von Gallen, in denen eine weitere starke Vermehrung der Pilzzellen stattfindet und schließlich die Karyogamie erfolgt. Die Hyphen fragmentieren, runden sich ab und reifen zu diploiden Teliosporen heran (Banuett & Herskowitz, 1996). Nach der Freisetzung der

1. Einleitung

Teliosporen, werden diese durch Wind, Regen oder Tiere verbreitet und können über Jahre keimungsfähig bleiben (Christensen, 1963). Keimen die Teliosporen aus, entstehen Probasidien in denen die Meiose erfolgt (Christensen, 1963).

1.4.2 Signaltransduktion während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

Treffen zwei kompatible Sporidien aufeinander, kommt es durch die entsprechenden Pheromone zur Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren (Spellig et al, 1994a). Das Signal wird anschließend über zwei Kaskaden weitergegeben: i) dem cAMP-Signalweg und ii) der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK)-Signalkaskade. In einem engen Zusammenspiel regulieren diese Signalwege die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Abb. 1.4) (Brefort et al, 2009; Kaffarnik et al, 2003). Dabei besteht der cAMP-Signalweg aus dem heterotrimeren G-Protein Gpa3, der Adenylatzyklase Uac1 und der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Dürrenberger et al, 1998; Gold et al, 1994; Krüger et al, 1998; Regenfelder et al, 1997). Letztere setzt sich aus der regulatorischen Untereinheit Ubc1 und der katalytischen Untereinheit Adr1 zusammen. Während des cAMP-Signalwegs aktiviert Gpa3 die Adenylatzyklase Uac1, woraufhin zyklisches AMP (cAMP) gebildet wird. Das produzierte cAMP wird an die regulatorische Untereinheit Ubc1 gebunden, wodurch Ubc1 nicht mehr mit Adr1 interagieren kann (Dürrenberger et al, 1998; Gold et al, 1994). Das nun freie Adr1 kann den Transkriptionsfaktor Prf1 phosphorylieren, wodurch die Transkription der *a*-Gene und *b*-Gene aktiviert wird (Brachmann et al, 2001; Hartmann et al, 1996; Kaffarnik et al, 2003).

Die MAPK-Kaskade wird nach der Pheromonstimulation vermutlich durch die Interaktion der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) Kpp4 mit der aktiven Ras-GTPase aktiviert (Lee & Kronstad, 2002). Kpp4 phosphoryliert anschließend die MAPKK Fuz7, die daraufhin die MAPK Kpp2 aktiviert (Müller et al, 2003b). Kpp2 selbst vermittelt die Bildung von Konjugationshyphen und phosphoryliert ebenfalls den Transkriptionsfaktor Prf1 (Müller et al, 2003b). Die Phosphorylierung und damit verbundene Aktivierung von Prf1 sowohl durch Adr1 als auch Kpp2 führt zur Stimulierung der Expression der *a*- und *b*-Gene (Hartmann et al, 1996; Kaffarnik et al, 2003). Wenn die unterschiedlichen *b*-Gene ein kompatibles bE/bW Heterodimer exprimieren, reguliert dieser als Transkriptionsfaktor anschließend die Expression von Genen, die für das filamentöse Wachstum und die pathogene Entwicklung wichtig sind (Kämper et al, 1995). Durch das Einbringen von *bE1/bW2* und *α1:mfa2*, konnten solopathogene, haploide Stämme generiert werden, die ohne vorherige Fusion Maispflanzen infizieren können (Kämper et al, 2006).

1. Einleitung

Nach erfolgter Bildung des dikaryotischen Filamentes, wird im zweiten Schritt durch äußere Pflanzensignale, wie z.B. die Hydrophobizität der Pflanzenoberfläche, die MAPK-Kaskade ein weiteres Mal aktiviert (Mendoza-Mendoza et al, 2009). Die Registrierung dieser Pflanzensignale wird unter anderem vom Transmembranmucin Msb2 und dem Plasmamembran Protein Sho1 übernommen, die auf bisher ungeklärte Weise die MAPK-Kaskade abermals aktivieren (Lanver et al, 2010). Da Einzeldelutionsmutanten von *msb2* und *sho1* nur eine reduzierte Virulenz zeigten, eine Doppeldelition dagegen apathogen ist, wird vermutet, dass beide unabhängig voneinander fungieren (Lanver et al, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Sho1 destabilisierend auf die MAPK Kpp6 wirkt (Lanver et al, 2010).

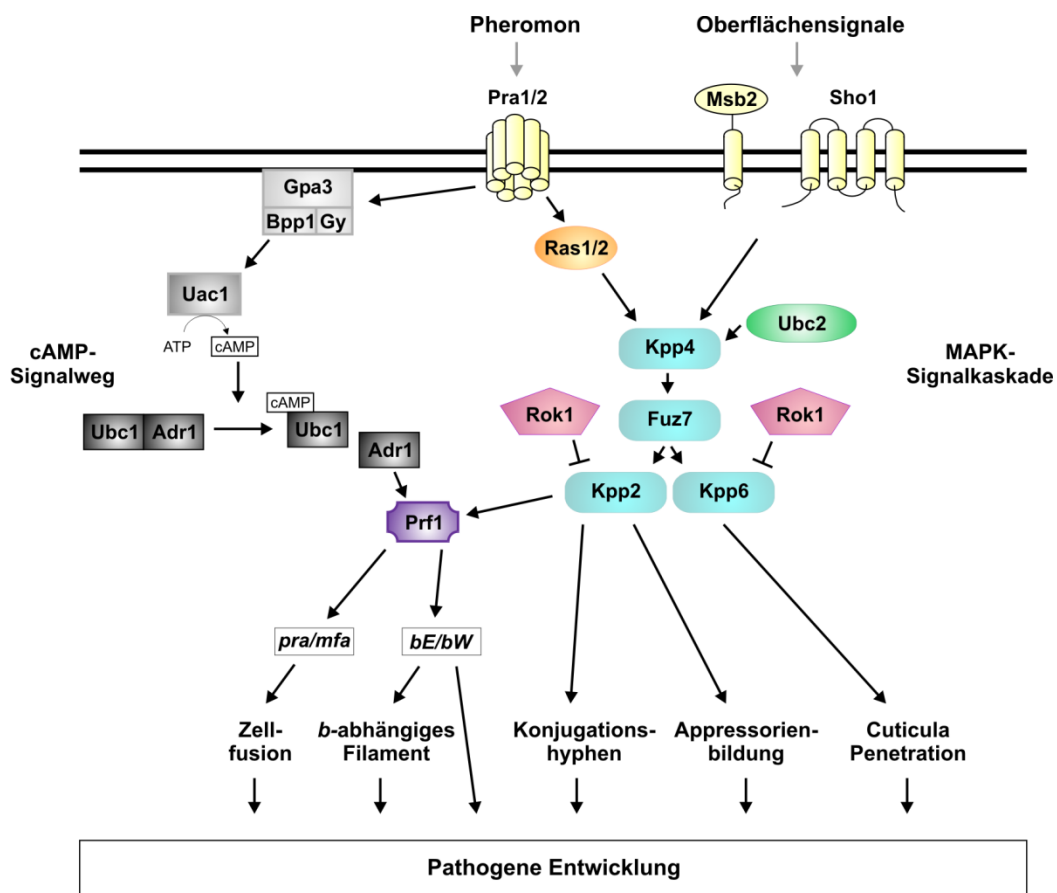


Abbildung 1.4: Zusammenspiel des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Signalkaskade während der pathogenen Entwicklung in *U. maydis*. Der cAMP-Signalweg (grau) und die MAPK-Signalkaskade (blau) werden durch pheromonelle Stimulation aktiviert, was wiederum in einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Prf1 (lila) resultiert. Prf1 aktiviert die Expression der *a*- und *b*-Gene. Diese leiten die Zellfusion und das filamentöse Wachstum ein. In einem zweiten Aktivierungs-Schritt wird die MAPK-Kaskade durch pflanzliche Signale aktiviert, welche über die Plasmamembran Proteine Msb2 und Sho1 wahrgenommen und an die MAPK-Kaskade weitergeleitet werden. Letztendlich führt dies zur Ausbildung von Appressorien und der Penetration der Pflanze (modifiziert nach (Lanver et al, 2010)).

1. Einleitung

Dieses *b*-induzierte Gen wird durch Fuz7 aktiviert und spielt im zweiten Schritt der pathogenen Entwicklung eine entscheidende Rolle (Brachmann et al, 2003; Di Stasio et al, 2009). Im Gegensatz zum sehr ähnlichen Kpp2, das für die Appressorienbildung zuständig ist, spielt Kpp6 eine wichtige Rolle bei der Penetration der Pflanzenoberfläche (Brachmann et al, 2003; Müller et al, 2003b). Beide MAPKs werden durch die dual-spezifische Phosphatase Rok1 negativ reguliert, die Kpp2 auch schon während der ersten Aktivierung der MAPK-Kaskade dephosphoryliert (Di Stasio et al, 2009). Eine weitere Komponente der MAPK-Signalkaskade ist das Gerüstprotein Ubc2. Dieses Protein zeigt eine duale Funktion, bei der zunächst der N-terminale Bereich mit Kpp4 und Rho-GTPasen interagiert. Der C-Terminus von Ubc2 spielt vor allem während des zweiten Schrittes der pathogenen Entwicklung eine entscheidende Rolle (Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 2001).

1.4.3 Regulation des filamentösen Wachstums in *U. maydis*

Dem dimorphen Pilz *U. maydis* ist es möglich, aus dem hefeartigen Wachstum in das filamentöse Wachstum zu wechseln. Dabei fungiert das kompatible bE/bW Heterodimer als Transkriptionsfaktor, der das Umschalten auf das filamentöse Wachstum einleitet (Brachmann et al, 2001; Kämper et al, 1995).

Eine weitere wichtige Komponente für das filamentöse Wachstum sind Rho-GTPasen, die unter anderem die Organisation des Zytoskeletts regulieren. In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die kleine Rho-GTPase Rac1 eine essentielle Rolle während des polaren Wachstums spielt. Die Deletion von *rac1* führt zu einem starken Polaritätsdefekt beim hefeartigen Wachstum, außerdem sind die Zellen nicht mehr in der Lage Filamente auszubilden (Mahlert et al, 2006). Eine Überexpression von Rac1 resultiert hingegen in einer Filamentbildung, die sich von der natürlich vorkommenden *b*-abhängigen Filamentbildung deutlich unterscheidet (Mahlert et al, 2006). So ist das Rac1-induzierte Filament beispielsweise von der MAPK-Kaskade abhängig, während eine Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers auch ohne MAPK-Kaskade zu einer Filamentbildung führt (Bauer, 2011; Müller et al, 2003b).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Rac1 während des polaren Wachstums durch den GEF Cdc24 aktiviert wird. Dies konnte sowohl *in vivo* als auch durch *in vitro* Assays gezeigt werden (Frieser et al, 2011; Hlubek, 2008). Eine Überexpression von Cdc24 führt zu einer Rac1-bedingten Filamentbildung (Frieser et al, 2011). Mit der PAK (p21 aktivierten Kinase) Cla4 konnte zudem ein Rac1-Effektor beschrieben werden, dessen Deletion einen ähnlichen

1. Einleitung

Phänotyp wie $\Delta rac1$ induziert (Leveleki et al, 2004). Weiterhin führt eine Überexpression von Rac1 in einem $\Delta cla4$ Hintergrund nicht zur Filamentbildung (Mahlert et al, 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Modell der Rac1 Aktivierung und Inaktivierung während des polaren bzw. filamentösen Wachstums erstellt (Abb.1.5)(Frieser et al, 2011). Dabei geht Cdc24 einen Komplex mit dem Gerüstprotein Bem1 sowie der PAK Cla4 ein und rekrutiert anschließend das inaktive GDP-gebundene Rac1. Im Anschluss katalysiert Cdc24 den Nukleotid-Austausch von Rac1, wodurch es zu einer Konformationsänderung von Rac1 kommt. Das GTP-gebundene Rac1 kann nun mit Cla4 interagieren und dieses aktivieren. Cla4 wiederum phosphoryliert Cdc24 und dies führt zum Abbau von Cdc24 (Frieser et al, 2011). Während des filamentösen Wachstums aktivieren die beiden Proteine Rac1 und Cla4 an der Zellspitze weitere bisher noch unbekannte Effektoren, die unter anderem die Morphogenese und Polarität steuern. Ein potentieller Effektor, der dabei eine Rolle spielen könnte, ist der Exozyst-Komplex.

Die Inaktivierung von Rac1 erfolgt durch Rac1-GAPs und führt zu einem Auflösen des Bem1-Rac1-Cla4-Komplexes. Das in der Membran gebundene inaktive Rac1 wird durch Rho-GDI herausgelöst und im Zytoplasma für eine nächste Runde bereitgehalten (Frieser et al, 2011).

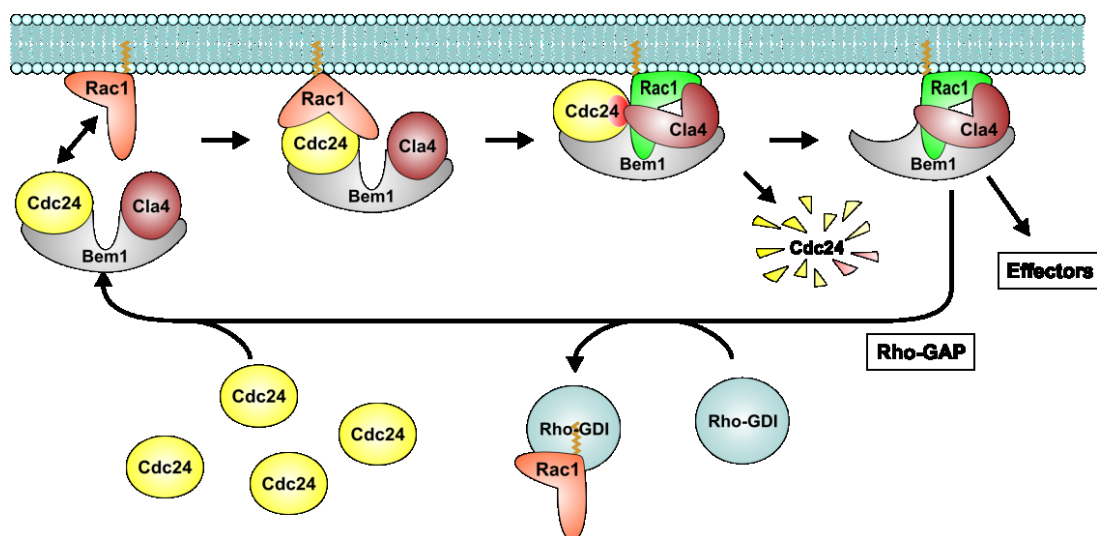


Abbildung 1.5: Modell der Rac1 Aktivierung und Inaktivierung an der Zellspitze. Inaktives Rac1 (orange) befindet sich an der Plasmamembran und wird vom GEF Cdc24 aktiviert. Cdc24 befindet sich dabei in einem Komplex mit dem Gerüstprotein Bem1 und der PAK Cla4. Die daraus resultierende Konformationsänderung von Rac1 (grün) ermöglicht die Aktivierung von Cla4. Im Anschluss wird Cdc24 durch Cla4 phosphoryliert und für eine Degradation vorbereitet. Danach können Rac1 und Cla4 weitere bisher unbekannte Effektoren aktivieren. Anschließend stimuliert der Rac1-GAP die intrinsische GTPase-Aktivität von Rac1, wodurch es inaktiviert wird und vom GDI aus der Membran herausgelöst wird und somit für einen neuen Zyklus zur Verfügung steht (Frieser et al, 2011).

1. Einleitung

Mit dem Exozyst-Komplex ist ein weiterer Komplex gegeben, der für das polare und somit auch das filamentöse Wachstum wichtig ist. Dieser Komplex besteht aus acht Komponenten, legt den Ort der Exozytose fest und vermittelt die Fusion von sekretorischen Vesikel mit der Ziellmembran (Abschnitt 1.3). In *U. maydis* existieren Homologe zu allen 8 Untereinheiten des Exozyst-Komplexes. Dabei wurden bisher die beiden Landmark-Proteine Sec3 und Exo70 sowie die Rab-GTPase Sec4, die sich an den sekretorischen Vesikel befinden und deren Effektor Sec15 näher charakterisiert (Jaeger, 2011; Schink, 2010; Wehr, 2008). Von diesen Komponenten ist Sec3 das am besten untersuchte Protein. Es lokalisiert wie die anderen Komponenten an der Hyphenspitze (Schink, 2010; Wehr, 2008). Eine Deletion von *sec3* führt zu starken morphologischen Defekten sowohl im hefeartigen Wachstum als auch während des filamentösen Wachstums, in welchem nur Filamentansätze ausgebildet werden. Es wird daher vermutet, dass Sec3 auch in *U. maydis* als Landmark-Protein für die Exozytose dient (Wehr, 2008). Aufgrund der Interaktion von Sec3 mit Rac1 wird angenommen, dass Sec3 ein möglicher Effektor von Rac1 während des polaren Wachstums sein könnte (Schink, 2010). Im Gegensatz zu $\Delta sec3$ Mutanten weisen $\Delta exo70$ Zellen keinen veränderten Phänotyp im hefeartigen Wachstum auf, weshalb noch nicht sicher ist, ob Exo70 in *U. maydis* ebenfalls ein Landmark-Protein darstellt (unveröffentlichte Daten).

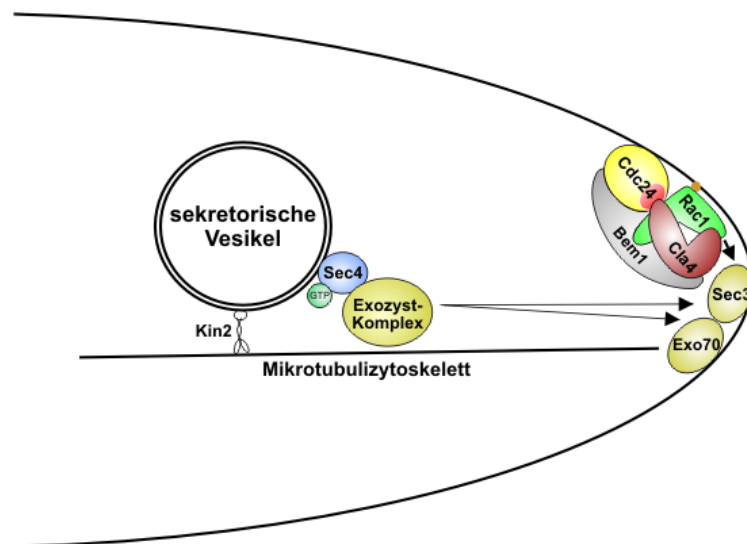


Abbildung 1.6: Der Exozyst-Komplex in *U. maydis*. Sec4 (blau) markierte sekretorische Vesikel gelangen über das Mikrotubulizytoskelett und das Motorprotein Kin2 an die wachsende Spitze. An der Spitze befinden sich Sec3 (braun) und Exo70 (braun), welche über die anderen Exozyst-Komponenten (braun) an die sekretorischen Vesikel binden und die Fusion der Vesikel mit der Membran vermitteln. Zudem interagiert Sec3 mit Rac1, das sich in einem Komplex (Bem1, Cdc24, Cla4 und Rac1) befindet.

1. Einleitung

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Langstreckentransport der von der Rab-GTPase Sec4 markierten Vesikel entlang des Mikrotubulizytoskeletts erfolgt und dabei die beiden Motorproteine Kin2 und Dynein benötigt werden (Schink, 2010). Interessanterweise zeigt eine Depletion von *sec4* nur leichte Defekte, während eine Herunterregulierung des möglichen Effektors *sec15* zu starken Polaritäts- und Zelltrennungsdefekten führt (Jaeger, 2011).

Neben dem polaren Wachstum ist der Exozyst-Komplex auch an der Zytokinese beteiligt, bei der in *U. maydis* zwei aufeinander folgende Septen gebildet werden (Weinzierl et al, 2002). Das primäre Septum wird zwischen Mutter- und Tochterzelle eingezogen und das sekundäre auf Seiten der Tochterzelle. Dazwischen bildet sich eine Vesikel gefüllte Fragmentierungszone, an der die Trennung der Zellen stattfindet (Banuett & Herskowitz, 2002; Schink & Bölker, 2009; Weinzierl et al, 2002). Sowohl Sec3 als auch Sec4 lokalisieren an den Septen von Mutter- und Tochterzelle und Deletionsmutanten beider Gene weisen einen Zelltrennungsdefekt auf (Schink, 2010; Wehr, 2008). Es wird daher angenommen, dass sekretorische Vesikel an die Fragmentierungszone transportiert werden und lytische Enzyme freigesetzt werden. Diese bewirken den Abbau der Zellwand in diesem Bereich und bewirken dadurch die Trennung der Zellen. Ein ähnlicher Vorgang wurde auch für *S. pombe* beschrieben werden (Martin-Cuadrado et al, 2005). In *U. maydis* interagiert Sec3 zudem mit der Rho-GTPase Cdc42, die eine wichtige Funktion während der Bildung des sekundären Septums besitzt. Es wurde daher vermutet, dass Cdc42 eventuell Sec3 an den *mother-bud-neck* rekrutiert (Schink, 2010).

1.5 Zielsetzung

Kleine GTPasen dienen als molekularer Schalter während einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Dabei durchlaufen sie einen Wechsel von einer inaktiven GDP- zu einer aktiven GTP-gebundenen Form, die es ihnen ermöglicht mit ihren Effektor-Proteinen zu interagieren. Der Austausch von GDP zu GTP kann spontan passieren oder durch GEFs katalysiert werden. Bisher wurden in *U. maydis* einige Rho-GEFs der Dbl-Familie und die Ras-GEFs, Ssl2 und Tfh1, näher untersucht. Zusätzlich zu diesen GEFs gibt es in *U. maydis* auch ein Homolog des ungewöhnlichen GEFs SmgGDS. Für diesen GEF konnte in Säugetierzellen bereits gezeigt werden, dass dieser sowohl Ras- als auch Rho-GTPasen aktivieren kann (Isomura et al, 1990; Yamamoto et al, 1990). In dieser Arbeit sollte dieser untypische GEF, Gds1, in *U. maydis* näher charakterisiert werden. Dabei sollte zum einen durch biochemische

1. Einleitung

Analysen ermittelt werden, welche GTPasen mit Gds1 interagieren und auf welche Weise sie von diesem aktiviert werden. Zudem sollte durch Deletionsmutanten, Interaktions- und Lokalisationstudien die Funktion und der Wirkungsort von Gds1 in *U. maydis* genauer analysiert werden.

Für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität ist es wichtig, dass eine gerichtete Sekretion stattfindet. Dieser Prozess wird ebenfalls von kleinen GTPasen über die Interaktion mit dem Exozyst-Komplex reguliert. Der Exozyst-Komplex besteht aus 8 Proteinen, von denen Sec3 und Exo70 als Landmark-Proteine dienen und den Exozytoseort an der Membran markieren. Sec3 aus *U. maydis* konnte bereits als ein essentielles Landmark-Protein für die Exozytose identifiziert werden. Eine Deletion des zweiten potenziellen Landmark-Protein Exo70 weist jedoch keinen besonderen Phänotyp während des hefeartigen Wachstums auf. In dieser Arbeit sollte daher die Funktion von Exo70 während der Exozytose genauer betrachtet werden. Hinzu kommt, dass frühere Studien bereits zeigen konnten, dass Sec3 mit den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 interagieren kann. Ein weiteres Ziel bestand darin, diese Interaktionen zu verifizieren und das Zusammenspiel von Sec3 und Rac1 zu untersuchen.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung von Gds1

2.1.1 Bioinformatische Identifizierung von Gds1 (Um11926)

In *U. maydis* gibt es neben den RhoGEFs der Dbp- und Dock180-Familien auch ein homologes Protein des untypischen GEFs SmgGDS. Dieser wurde erstmals aus Rinderhirnzellen isoliert und besteht aus einer Reihe von Armadillo (ARM) Wiederholungen (Isomura et al, 1990; Peifer et al, 1994; Yamamoto et al, 1990). Das Gds1 Homolog aus *U. maydis* (Um11926) ist ein 965 Aminosäuren langes Protein und besitzt ebenfalls ARMs, die eine 27 %ige Aminosäureidentität zum humanen SmgGDS (GenBank: NP 001093897) aufweisen (Abb. 2.1). BLASTP Analysen zur Suche nach Homologen von Gds1 in anderen Pilzen ergaben eine starke Konservierung der Aminosäuresequenz. So gibt es ähnliche Proteinsequenzen unter anderem in *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* und *Schizosaccharomyces pombe*. Auffällig ist, dass bei dieser Analyse kein Homolog in *S. cerevisiae* zu finden war. Die Suche in einer speziellen *S. cerevisiae* Datenbank (<http://www.yeastgenome.org/>) nach einem Homolog von Gds1 hingegen ergab, dass Bem4p als homologes Protein in Frage kommt (E-Value = 0,036). Das Hefe Bem4p Protein kann mit Rho-GTPasen interagieren und spielt als Gerüstprotein eine wichtige Rolle in deren Signalwegen (Hirano et al, 1996; Mack et al, 1996).

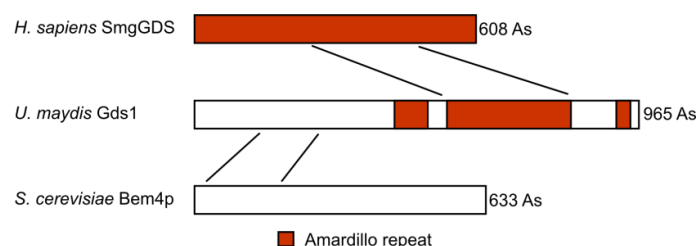


Abbildung 2.1: Vergleichende Darstellung der Proteine SmgGDS aus *H. sapiens*, Gds1 aus *U. maydis* und Bem4p aus *S. cerevisiae*. Die Domänen wurden mit Hilfe von Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) bestimmt. SmgGDS aus *H. sapiens* ist ein 608 As langes Protein und besteht aus einer Reihe von Armadillo Wiederholungen. Diese zeigen eine 27 % Identität zu Gds1 aus *U. maydis*. Bem4p (633 As), das Gds1 Homolog von *S. cerevisiae*, zeigt keine konservierten Domänenstruktur.

2.1.2 $\Delta gds1$ Mutanten zeigen einen Defekt im Kreuzungsverhalten und im filamentösen Wachstum

Um erste Hinweise auf die Funktion von Gds1 in *U. maydis* zu erhalten, wurden Deletionsmutanten in verschiedenen Wildtyp Hintergründen hergestellt. Dabei wurde das *gds1* Gen mittels homologer Rekombination durch eine Resistenz-Kassette ersetzt. Zunächst erfolgte eine nähere Untersuchung des Kreuzungsverhaltens mit den kompatiblen Stämmen Bub8 (*a2 b4*) und FB1 (*a1 b1*) sowie deren $\Delta gds1$ Mutanten. Wenn haploide Stämme kompatibel zueinander sind, bilden sie Konjugationshyphen und es kommt zur Zellfusion. Anschließend wird ein dikaryotisches Filament gebildet, das auf aktivkohlehaltigen Platten ein weißes Mycel bildet (Day & Anagnostakis, 1971). In einem Kreuzungstest konnte beobachtet werden, dass die Kreuzung der $\Delta gds1$ Mutanten nach dem ersten Tag im Vergleich zum Wildtyp nur eine sehr schwache Filamentbildung aufwies. Der Unterschied zu Wildtypzellen ist nach zwei Tagen allerdings kaum noch erkennbar (Abb. 2.2 A). Aufgrund der Filamentbildung kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer Zellfusion zwischen den beiden $\Delta gds1$ Mutanten gekommen ist. Es stellt sich die Frage, warum nach einem Tag die Kreuzung der $\Delta gds1$ Mutanten nur eine schwache Filamentbildung zeigt. Grund hierfür könnte eine Verzögerung der Zellfusion oder der Ausbildung des dikaryotischen Filaments sein. Um zu überprüfen, ob die Bildung des *b*-Filaments durch die Deletion von *gds1* gestört ist, wurde ein Derivat des solopathogenen Stammes SG200 benutzt, welches zusätzlich noch einen Appressorienmarker mit einer Nourseothricin (Nat)-Resistenz enthält. SG200 besitzt ein kompatibles bE1/bW2 Heterodimer und ist zur autokrinen Pheromonstimulation fähig. Dadurch ist dieser Stamm in der Lage, ohne Zellfusion ein *b*-Filament zu erzeugen und Maispflanzen zu infizieren (Kämper et al, 2006). Wird *gds1* in diesem Stammhintergrund deletiert, führt dies zu einem reduzierten Filamentphänotyp. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die Deletion von *gds1* zu einer Störung des *b*-Filaments führt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von zwei Kopien des vom nativen Promotor kontrollierten *gds1* Allels in den *ip*-Lokus den Filamentphänotyp einer $\Delta gds1$ Mutante wieder komplementieren kann (Abb. 2.2 B). Dies bestätigt, dass der beobachtete Filamentphänotyp der *gds1* Deletionsmutante auf das Fehlen dieses Genes zurückzuführen ist. Da eine Einfachintegration von $P_{gds1}::gds1$ dafür nicht ausreichend war, könnte man vermuten, dass nicht genügend Gds1 gebildet wird, was auf einen unvollständigen *gds1* Promotorbereich hinweisen könnte (Daten nicht gezeigt).

2. Ergebnisse

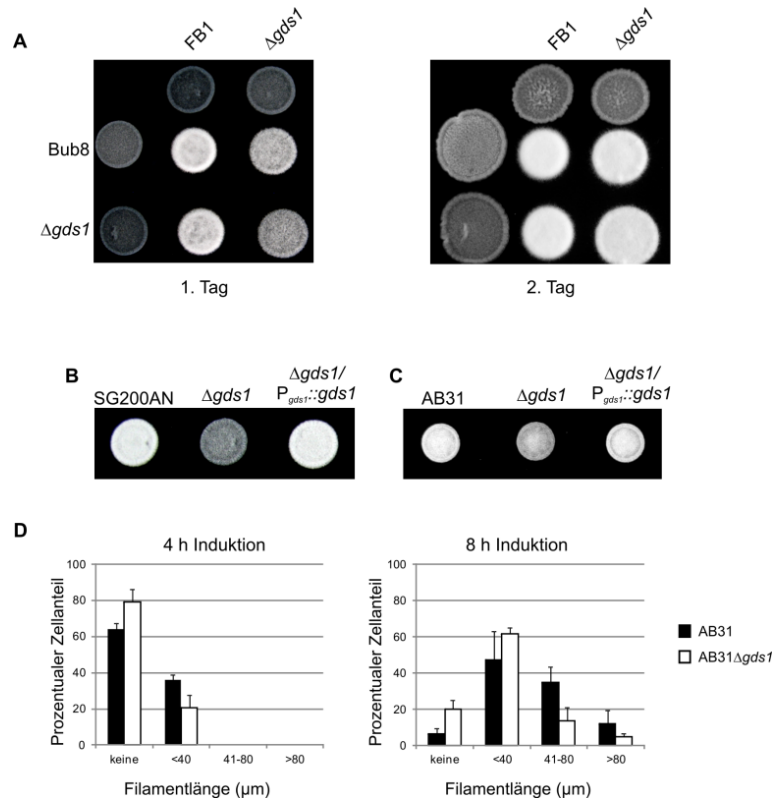


Abbildung 2.2: Die Deletion von *gds1* führt zu einer Reduktion des Kreuzungsverhaltens und des filamentösen Wachstums. (A) In einem Kreuzungstest wurden die Bub8- und FB1-Wildtypstämme und deren Derivate alleine oder als Mischung (1:1) auf aktivkohlehaltige PD-Platten getropft und bei 20 °C für zwei Tage inkubiert. Kompatible Stämme bilden nach erfolgreicher Zellfusion ein dikaryotisches Filament, welches auf aktivkohlehaltigen Platten als weiße Kolonie sichtbar ist. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die *gds1* Deletionsmutante am ersten Tag (linkes Bild) eine deutlich abgeschwächte weiße Färbung der Kolonie. Nach zwei Tagen (rechtes Bild) gleicht sich die Mutante dem Wildtyp an. (B) Tropftest von dem filament-bildenden Stamm SG200AN, SG200AN $\Delta gds1$ und SG200AN $\Delta gds1 P_{gds1::gds1}$ auf aktivkohlehaltigen PD-Platten. Nach 24 h Inkubation bei 20 °C wurde die Platte fotografiert. Die *gds1* Deletion in SG200AN zeigt eine schwache Filamentbildung, welche durch das Einbringen von zwei Kopien des *gds1* Allels in den *ip*-Lokus wieder komplementiert wird. (C) Tropftest von AB31, AB31 $\Delta gds1$ und AB31 $\Delta gds1 P_{gds1::gds1}$ auf Aktivkohle-CM – Platten (2 % Arabinose). Nach 24 h Inkubation bei 20 °C wurde die Platte fotografiert. Die Arabinose induzierte Überexpression von bW2/bE1 in AB31 resultiert in der Bildung von *b*-Filamenten wie bei SG200AN. Die Deletion von *gds1* in AB31 führt ebenso wie in SG200AN zu einer schwächeren Filamentbildung, welche durch das Einbringen von zwei *gds1* Allel in den *ip*-Lokus wieder komplementiert wird. (D) Darstellung des Anteils von Zellen ohne und mit Filament in den angezeigten Längenbereichen (unter 40 μm , zwischen 41 und 80 μm und über 80 μm). Die Stämme wurden in YNB mit 2 % Arabinosemedium angezogen und nach 4 h bzw. 8 h mikroskopiert. Mit Hilfe der ImageJ Software wurde die Filamentlänge bestimmt und aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten der prozentuale Zellanteil und Mittelwert berechnet (Excel). Die *gds1* Deletionsmutante zeigt nach 4 h Induktion rund 20 % mehr Zellen ohne Filament als AB31. Nach 8 h war weiterhin eine verzögerte Filamentbildung bei den $\Delta gds1$ Mutanten zu beobachten.

Anschließend wurde überprüft, ob das reduzierte *b*-Filament einer $\Delta gds1$ Mutante durch Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers supprimiert werden kann. Mit Hilfe

2. Ergebnisse

homologer Rekombination wurde eine *gds1* Deletion im AB31 Stamm erzeugt, der ein kompatibles bE1/bW2 Heterodimer unter der Kontrolle des Arabinose- und Glukose-regulierbaren *crg*-Promotor besitzt (Brachmann et al, 2001). Ein Tropftest auf Aktivkohle-CM-Platten (2 % Arabinose) zeigte, dass AB31 Δ *gds1* ebenfalls eine reduzierte Filamentbildung aufweist (Abb. 2.2 C). Durch das Einbringen von zwei *gds1* Allelen in den *ip*-Lokus konnte auch in diesem Stammhintergrund der Phänotyp komplementiert werden.

Als nächstes sollte analysiert werden, ob die reduzierte Filamentbildung die Folge einer verzögerten Filamentbildung ist. Erste Hinweise deuteten sich im Kreuzungstest an. Aufgrund des nur noch sehr schwachen Unterschiedes zwischen der Wildtypkreuzung und den Δ *gds1* Mutanten am zweiten Tag, ist eine grundsätzliche Störung der Filamentbildung auszuschließen. Um dies zu überprüfen, wurde der Stamm AB31 sowie die *gds1* Deletionsmutante unter Arabinose Bedingungen für 4 Stunden bzw. 8 Stunden induziert und anschließend mikroskopiert. Mit Hilfe des Programmes ImageJ wurden die Filamentlängen bestimmt. In Abbildung 2.2 D ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion von *gds1* zu einer zeitlichen Verzögerung in der Filamentbildung führt. So hatte beispielsweise eine Δ *gds1* Kultur nach 4 Stunden Induktion ca. 20 % mehr Zellen ohne Filament als der Stamm AB31. Auch nach 8 Stunden Überexpression von bE1/bW2 zeigten nur rund 13 % der Δ *gds1* Zellen eine Filamentlänge zwischen 41 μ m und 80 μ m während es im Wildtyp schon 35 % der Zellen waren. Diese Verzögerung konnte auch noch nach 12 Stunden Induktion beobachtet werden (nicht gezeigt).

Neben dem *b*-induzierten-Filament gibt es in *U. maydis* zudem noch ein Rac1-induziertes Filament, welches durch die Überexpression der kleinen Rho-GTPase Rac1 entsteht (Mahlert et al, 2006). Rac1 ist in *U. maydis* für das polare Wachstum essentiell. Eine Deletion von *rac1* führt zu starken Defekten in der Zellmorphologie und der Zellpolarität. Infolge dessen sind diese Zellen nicht mehr in der Lage das *b*-induzierte Filament zu bilden (Mahlert et al, 2006). Beide Filamente unterscheiden sich dadurch, dass bei einer Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers nur ein Filament gebildet wird und sich die Zellen in einem Zellzyklusarrest befinden. Rac1 überexprimierte Zellen können dagegen mehrere Filamente erzeugen und es findet keine Blockade der Zellkernteilung (Mitose) statt (Mahlert et al, 2006). Von humanen SmgGDS ist bekannt, dass dieses auch mit Rac1 interagieren kann (Hiraoka et al, 1992). Die Vermutung, dass eine Deletion von *gds1* vielleicht auch eine Störung des Rac1-Filaments verursacht, liegt nahe. Ein Tropftest auf Aktivkohle-CM-Platte (2 % Arabinose) konnte zeigen, dass auch das Rac1-induzierte

2. Ergebnisse

Filament in einem $\Delta gds1$ Hintergrund eine schwächere Filamentbildung aufweist (Abb. 2.3 A). Mikroskopische Analysen bestätigten, dass diese Störung ebenfalls auf eine verzögerte Filamentbildung zurückzuführen ist (Abb. 2.3 B). So besitzen ca. 42 % der Zellen einer $\Delta gds1$ Kultur nach 4 Stunden Induktion unter Arabinose noch keine Filamente. In einer Bub8 $P_{crg}::rac1$ Kultur waren es nur noch 20 % der Zellen. Ebenso konnte nach 8 Stunden Überexpression von Rac1 eine Verzögerung der Filamentbildung in $\Delta gds1$ Mutanten festgestellt werden. Etwa 11 % der Zellen weisen eine Filamentlänge größer als 80 μm auf, wohin gegen es bei einer Kultur mit $gds1$ schon 44 % waren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Gds1 eine wichtige Rolle während des filamentösen Wachstums spielt.

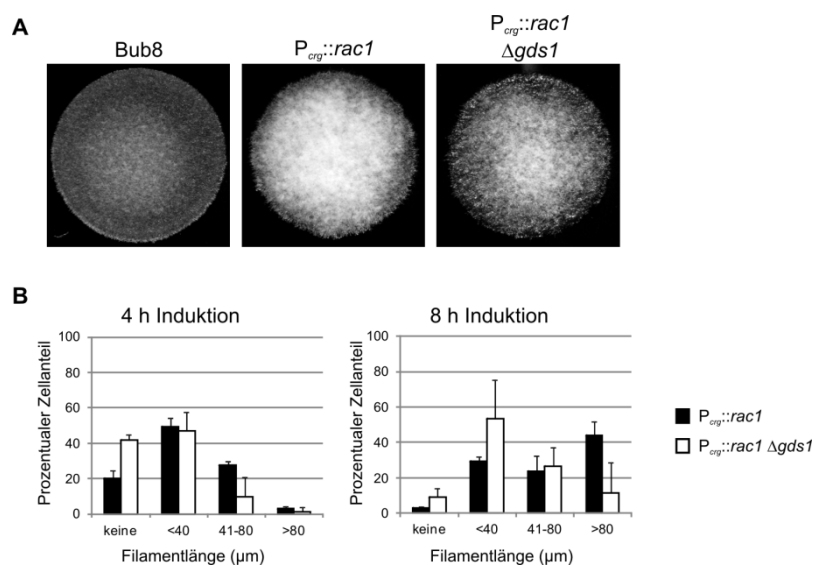


Abbildung 2.3: Die Deletion von $gds1$ führt zu einem verzögerten Rac1-induzierten-Filament. (A) Tropftest von Bub8, Bub8 $P_{crg}::rac1$ und Bub8 $P_{crg}::rac1 \Delta gds1$ auf Aktivkohle-CM-Platten (2 % Arabinose). Die Überexpression von Rac1 führt zu einer Filamentbildung, welche auf aktivkohlehaltigen Platten als weiße Kolonie sichtbar ist. Nach 16 h Inkubation bei 20 °C wurde die Platte fotografiert. Die Deletion von $gds1$ resultiert in einer schwächeren Filamentbildung. **(B)** Verhältnismäßige Darstellung des Anteils von Zellen ohne und mit Filament in den angegebenen Längenbereichen (unter 40 μm , zwischen 41 und 80 μm und über 80 μm). Die Stämme wurden in YNB mit 2 % Arabinosemedium angezogen und nach 4 h bzw. 8 h mikroskopiert. Mit Hilfe der ImageJ Software wurde die Filamentlänge bestimmt und aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten der prozentuale Zellanteil und Mittelwert berechnet (Excel). Die $gds1$ Deletionsmutante weist nach 4 h Induktion rund 20 % mehr Zellen ohne Filament auf als nach Rac1 Überexpression in einem Wildtyp Hintergrund. Auch nach 8 h war noch eine verzögerte Filamentbildung bei den $\Delta gds1$ Mutanten zu beobachten.

Aufgrund des verzögerten filamentösen Wachstums einer $\Delta gds1$ Mutante, stellte sich die Frage, ob die Deletion von $gds1$ auch während des hefeähnlichen Wachstums zu einer Verzögerung im Wachstum führt. Ein Tropftest mit Bub8 und Bub8 $\Delta gds1$ auf Vollmedium Platten wurde durchgeführt, um diese Hypothese zu analysieren. Es zeigte sich, dass die

2. Ergebnisse

Deletion von *gds1* keinen signifikanten Defekt auf das knospende Wachstum hat (Abb. 2.4 A). Desweiteren ergaben mikroskopische Analysen, dass $\Delta gds1$ Mutanten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Abb. 2.4 B).

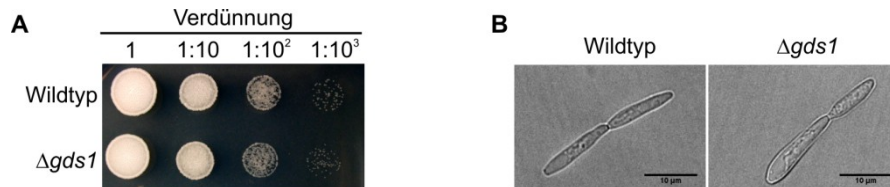


Abbildung 2.4: Untersuchung der Deletion von *gds1* im haploiden Stammhintergrund (Bub8). (A) Tropfttest von Wildtyp und $\Delta gds1$ Mutanten auf PD-Platten. Von beiden Stämmen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nach zwei Tagen bei 28 °C wurde die Platte fotografiert. Die $\Delta gds1$ Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp kein verzögertes Wachstum. (B) Mikroskopische Untersuchung von $\Delta gds1$ Mutanten zeigten keine morphologischen Veränderungen.

2.1.3 Gds1 wird für die pathogene Entwicklung benötigt

Aufgrund der Defekte von $\Delta gds1$ Mutanten im Kreuzungsverhalten und beim filamentösen Wachstum, lag die Vermutung nahe, dass diese ebenfalls eine Störung in ihrer Virulenz haben könnten. Deshalb wurden sieben Tage alte Maispflanzen mit den Stämmen SG200AN und dessen Derivate infiziert. Nach 11 Tagen erfolgte die Auswertung der Symptome in 6 Kategorien. Im Vergleich zu SG200AN wies SG200AN $\Delta gds1$ eine reduzierte Tumorbildung auf (Abb. 2.5 A). Nach Infektion mit $\Delta gds1$ Mutanten besaßen nur 24 % der Pflanzen große Tumore, während es bei SG200AN ca. 48 % der Pflanzen waren. Dieser Phänotyp konnte durch das Einbringen von zwei Kopien des *gds1* Allels im *ip*-Lokus wieder komplementiert werden. Dies zeigt, dass die reduzierte Virulenz auf das Fehlen des *gds1* Gen zurückzuführen ist.

Da es sich bei SG200 und dessen Derivate um künstlich erzeugte solopathogene Stämme handelt, sollte ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Pathogenität von $\Delta gds1$ nur in diesem Stamm auftritt. Daher wurde die Virulenz von $\Delta gds1$ Mutanten auch mit Hilfe der kompatiblen Stämme Bub8 und FB1 analysiert. Die Kreuzung der $\Delta gds1$ Mutanten zeigte im Vergleich zu den Wildtypstämmen ebenfalls eine reduzierte Pathogenität (Abb. 2.5 B). Etwa 58 % der Pflanzen, die mit der Kreuzung der Wildtypstämmen infiziert wurden, waren nach 11 Tagen tot. Bei Infektionen mit den $\Delta gds1$ Mutanten hingegen waren nur 36 % tote Pflanzen zu erkennen. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Gds1 auch in die pathogene Entwicklung involviert ist.

2. Ergebnisse

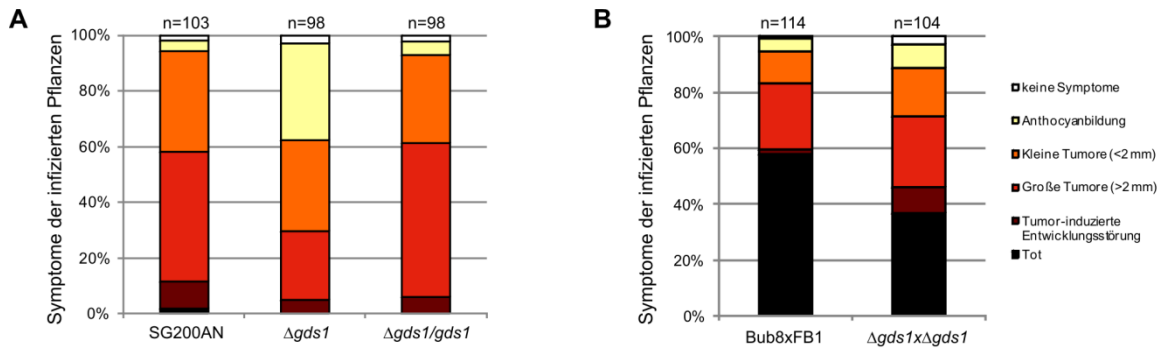


Abbildung 2.5: Verminderte Virulenz von *gds1* Mutanten. (A) Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit dem solopathogenen Stamm SG200AN (mit Appressorienmarker-Nat-Kassette) und dessen Derivate infiziert. Nach 11 Tagen erfolgte die Auswertung der Symptome in 6 Kategorien (Legende). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte wurden im Verhältnis zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt. Die Deletion von *gds1* führt zu einer reduzierten Virulenz, welche durch das Einbringen von zwei Kopien des *gds1* Allels in den *ip*-Lokus wieder komplementiert werden kann. (B) Von den Wildtypstämmen Bub8 und FB1 sowie den jeweiligen *gds1* Deletionsmutanten wurden kompatible Mischungen (1:1) hergestellt und diese wie beschrieben behandelt. Auch hier konnte die reduzierte Virulenz der $\Delta gds1$ Mutante bestätigt werden.

2.1.4 Lokalisierung von Gds1-GFP in hefeartigen und filamentösen Zellen

Um weitere Hinweise auf die zelluläre Funktion von Gds1 in *U. maydis* zu erhalten, wurde als nächstes die Lokalisation des Proteins während des knospenden und filamentösen Wachstums näher untersucht. Mit Hilfe homologer Rekombination konnte eine C-terminale GFP-Fusion am genomischen *gds1* Locus generiert werden. Fluoreszenzmikroskopische Analysen ergaben, dass Gds1-GFP während des knospenden Wachstums im Zytoplasma lokalisiert und punktförmige Akkumulationen in der gesamten Zelle bildet (Abb. 2.6 A). Aufgrund der verzögerten Filamentbildung der $\Delta gds1$ Mutanten wurde vermutet, dass Gds1 während des filamentösen Wachstums eine polare Lokalisation aufweist, wie es für die Polaritätsproteine Bem1 (Gerüstprotein), Cla4 (Rac1-Effektor) und Cdc24 (Rac1 GEF) gezeigt werden konnte (Frieser et al, 2011). Interessanterweise weist Gds1-GFP in filamentösen Zellen eine vergleichbare Lokalisation auf wie in knospenden Zellen (Abb. 2.6 B). Um sicherzustellen, dass die verwendeten Fusionsproteine noch funktionell sind, wurden zwei *gds1-gfp* Konstrukte in den *ip*-Lokus der SG200AN $\Delta gds1$ Mutante integriert, die unter der Kontrolle des *gds1* Promotor stehen. Mittels aktivkohlehaltiger-PD-Platten konnte gezeigt werden, dass Gds1-GFP den Filamentphänotyp von $\Delta gds1$ komplementieren kann (Abb. 2.6 C). Die Analyse einer N-terminalen GFP-Fusion, für die das $P_{etef}::GFP-Gds1$ Konstrukt in den *ip*-Lokus der SG200AN $\Delta gds1$ Mutante integriert wurde, zeigt die gleiche Lokalisation wie Gds1-GFP und ist ebenfalls funktional (nicht gezeigt).

2. Ergebnisse

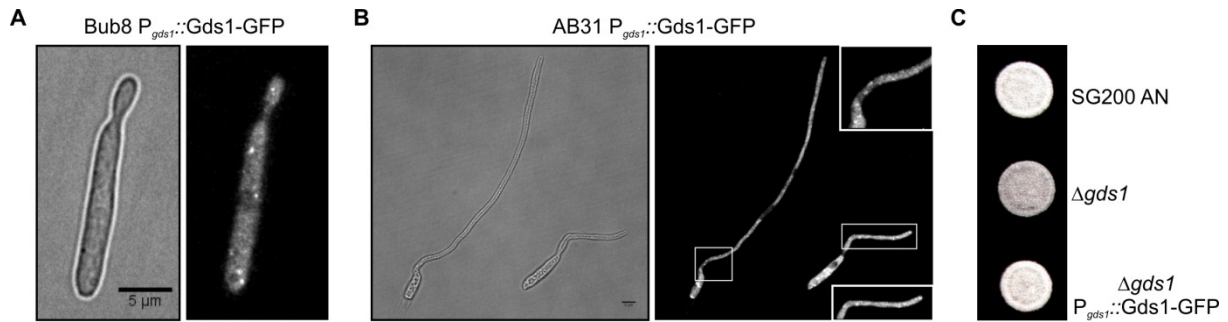


Abbildung 2.6: Lokalisation von Gds1-GFP in *U. maydis*. (A) Untersuchung der Gds1 Lokalisation während des knospenden Wachstums. Es wurde eine C-terminale GFP-Fusion von *gds1* am genomischen Locus generiert. Gds1-GFP konnte im Zytoplasma und als punktförmige Akkumulationen in der gesamten Zelle beobachtet werden. Hinsichtlich des schwachen GFP-Signals erfolgte eine Dekonvoluierung der Bilder mit Hilfe der ImageJ Software. (B) Die Lokalisation von Gds1-GFP wurde während des filamentösen Wachstums untersucht und wiederum konnten Akkumulationen von Gds1-GFP beobachtet werden. (C) Die Gds1-GFP Integration in den *ip*-Lokus der SG200AN $\Delta gds1$ Mutante konnte den Phänotyp komplementieren und die Funktionalität der GFP-Fusion bestätigen.

2.2 Analyse von Gds1 während der pathogenen Entwicklung

2.2.1 Gds1 interagiert mit Komponenten der Signaltransduktionskaskade für die pathogene Entwicklung und mit kleinen GTPasen

Um die Funktion von Gds1 während der pathogenen Entwicklung und des polaren Wachstums näher zu charakterisieren, wurde Gds1 auf potentielle Interaktionspartner hin untersucht werden.

Denkbare Interaktionspartner von Gds1 sind kleine GTPasen, die eine wichtige Rolle sowohl in der pathogenen Entwicklung als auch im filamentösen Wachstum spielen. Humanes SmgGDS fungiert als GEF für Ras- und Rho-GTPasen und kann daher mit GTPasen interagieren und diese regulieren (Isomura et al, 1990; Yamamoto et al, 1990). Auch das Homolog Bem4p aus *S. cerevisiae* interagiert mit verschiedenen Rho-GTPasen und der Kinase Ste20p (Drees et al, 2001). Daher wurde Gds1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid Test mit Ras/Rho-GTPasen, dem Transmembranmucin Msb2, dem Plasmamembranprotein Sho1 und dem MAPKKK interagierenden Protein Ubc2 getestet. Msb2 und Sho1 wirken oberhalb der MAPK-Kaskade und nehmen Oberflächensignale auf (Lanver et al, 2010). Ubc2 dagegen dient als Gerüstprotein und kann mit der MAPKKK (Kpp4) und den Ras/Rho-GTPasen interagieren (Bauer, 2011; Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 2001). Da Msb2 und Sho1 Transmembrandomänen besitzen, wurden verkürzte Allele benutzt (Lanver et al, 2010). Bei den Ras- und Rho-GTPasen wurden die CAAX-Motive, welche für die

2. Ergebnisse

Prenylierung und anschließende Rekrutierung an die Membran benötigt werden, deletiert. Die Plasmide pGADT₇ und pGBKT₇ für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse sowie die entsprechenden Derivate mit *msb2*⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰, *cdc42*^{-CAAX}, *rac1*^{-CAAX}, *ras1*^{-CAAX}, *rho1*^{-CAAX}, *rho2*^{-CAAX}, *rho3*^{-CAAX}, *sho1*¹³¹⁻³³⁵ und *ubc2*, wurden von D. Lanver zur Verfügung gestellt.

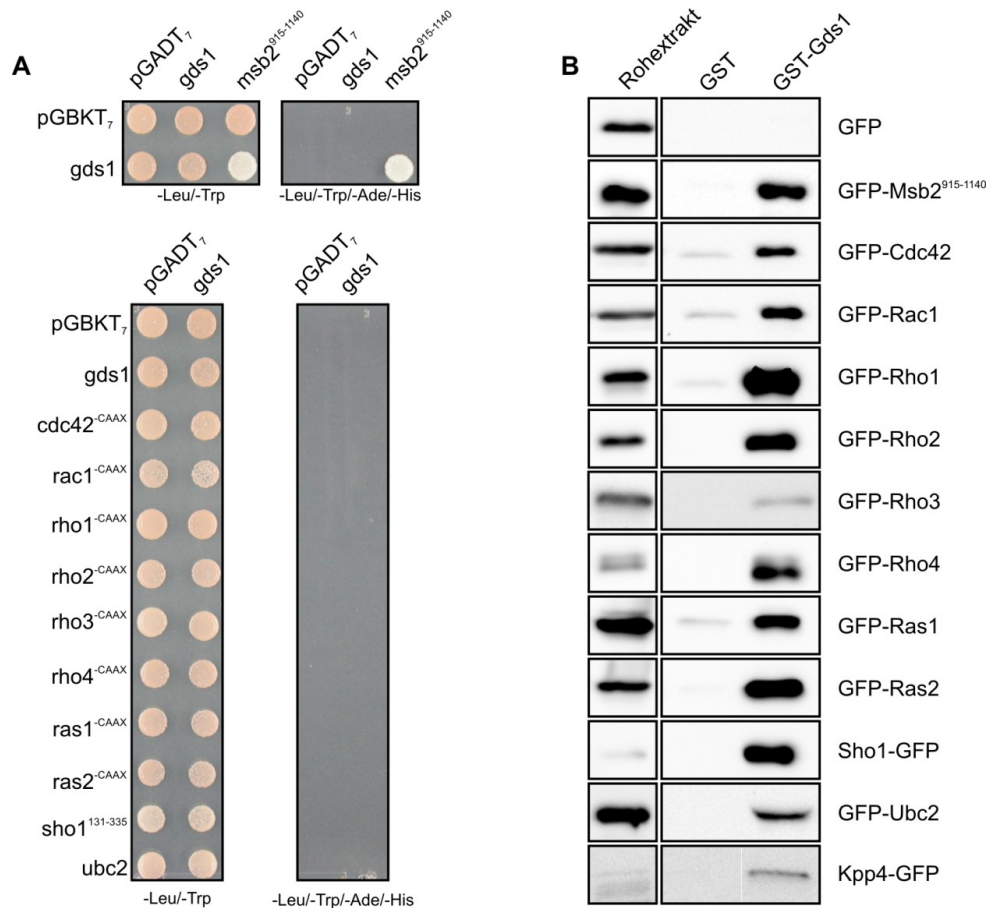


Abbildung 2.7: In vivo und in vitro Interaktionsstudien von Gds1 mit verschiedenen GTPasen und Komponenten der Signaltransduktionskaskade für die pathogene Entwicklung. (A) Hefe-zwei-Hybrid Test von Gds1 mit verschiedenen GTPasen (ohne CAAX-Motiv), Msb2⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰, Sho1¹³⁵⁻³³⁵ und Ubc2. Die Plasmide pGBKT₇ (DNA-Bindedomäne, Trp1) und pGADT₇ (Aktivierungs-Domäne, Leu2) mit den zu testenden Proteinen wurde in den Hefestamm AH109 co-transformiert. Nur bei einer Interaktion kann der jeweilige Stamm auf SC-Leu/-Trp/-Ade/-His Platten wachsen. Ein Tropftest zeigte, dass Gds1 mit Msb2⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰ interagiert, jedoch nicht mit den anderen getesteten Proteinen. (B) In vitro Interaktions Assay mittels GST-Kopräzipitation. GST-Gds1 wurde an Glutathion Sepharose Beads immobilisiert und mit Proteinextrakten aus *U. maydis* Stämmen, welche die GFP-markierten Proteine überexprimieren, inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Auftrennung der Proben mit Hilfe von SDS-PAGE. Western Blot Analysen mit anti-GFP Antikörpern zeigen, dass Gds1 sowohl mit den getesteten GTPasen als auch mit Msb2⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰, Sho1, Ubc2 und Kpp4 interagieren kann. Als Negativkontrolle diente GFP.

Der pGBKT₇ Vektor besitzt neben der DNA-Bindedomäne, ein Myc-Epitop, einen Trp1 Auxotrophiemarker und eine Kanamycinresistenz. Der pGADT₇ Vektor dagegen enthält die

2. Ergebnisse

Gal4 Aktivierungsdomäne, ein HA-Epitop, einen Leu2 Auxotrophiemarker und eine Ampicillinresistenz. Nach Herstellung weiterer Derivate von pGADT₇ und pGBKT₇ mit *gds1*, *ras2*^{CAAX} und *rho4*^{CAAX}, wurden alle zu testenden Varianten in den Hefestamm AH109 co-transformiert und auf SC-Leu/-Trp selektioniert. Mittels Western Blot Analyse wurde die Expression der Fusionsproteine bestätigt (nicht gezeigt). Findet eine Interaktion zwischen den getesteten Proteinen statt, kann die Funktion des Gal4 Transkriptionsfaktors wieder hergestellt werden. Dies führt zur Expression von Reportergenen wie zum Beispiel HIS3 und ADE2. In Abbildung 2.7 A ist dargestellt, dass alle getesteten Transformanten auf der Kontrollplatte (SC-Leu/-Trp) wachsen können, jedoch nur bei dem Stamm mit pGBKT₇*gds1* und pGADT₇*msb2*⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰ konnte eine Kolonie auch auf SC-Leu/-Trp/-Ade/-His Platte beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass Gds1 mit Mbs2 *in vivo* interagieren kann.

Von SmgGDS (607) ist bekannt, dass das CAAX-Motiv für eine erfolgreiche Interaktion mit den GTPasen benötigt wird (Schuld et al, 2014b). Da für den Hefe-Zwei-Hybrid-Test dieses jedoch deletiert wurde, um eine Interaktion im Zellkern zu ermöglichen, wurde eine GST-Kopräzipitationen von Gds1 und den GTPasen mit CAAX-Motiv durchgeführt. Nach Überexpression in *E. coli* und Aufreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie, wurde GST-Gds1 an Glutathion Sepharose Beads immobilisiert und mit Proteinextrakten aus *U. maydis* Stämmen inkubiert. Diese Stämme exprimierten GFP-Fusionen der zu testenden Proteine bzw. als Negativkontrolle nur GFP. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Gds1 mit den Ras- und Rho-GTPasen interagieren kann (Abb. 2.7 B). Desweiteren fand eine Untersuchung auf Interaktion zwischen Gds1 mit der MAPKKK Kpp4, Sho1, Ubc2 und Mbs2⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰ statt. Auch hier konnten Interaktionen festgestellt werden.

2.2.2 Die Doppeldeletion von *gds1* und *msb2* bzw. *sho1* führt zu einer weiteren Reduzierung der Pathogenität und kann durch eine Deletion von *rok1* supprimiert werden

Aufgrund der Interaktion von Gds1 mit Mbs2⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰ und Sho1 sollten im Folgenden Doppeldeletionsmutanten von *gds1* und *msb2* bzw. *sho1* näher untersucht werden. In Abbildung 2.8 A ist der Signalweg von Mbs2 und Sho1 schematisch dargestellt. Beide Proteine wirken als Sensoren für Oberflächensignale und geben das Signal, auf bis lang noch ungeklärte Weise, an die MAPK-Kaskade weiter und dies führt zur pathogenen Entwicklung (Lanver et al, 2010). Die Einzeldelationen von *msb2* und *sho1* resultieren in einer reduzierten Virulenz (Lanver et al, 2010). Wird zusätzlich *gds1* deletiert, wird dieser Defekt noch verstärkt.

2. Ergebnisse

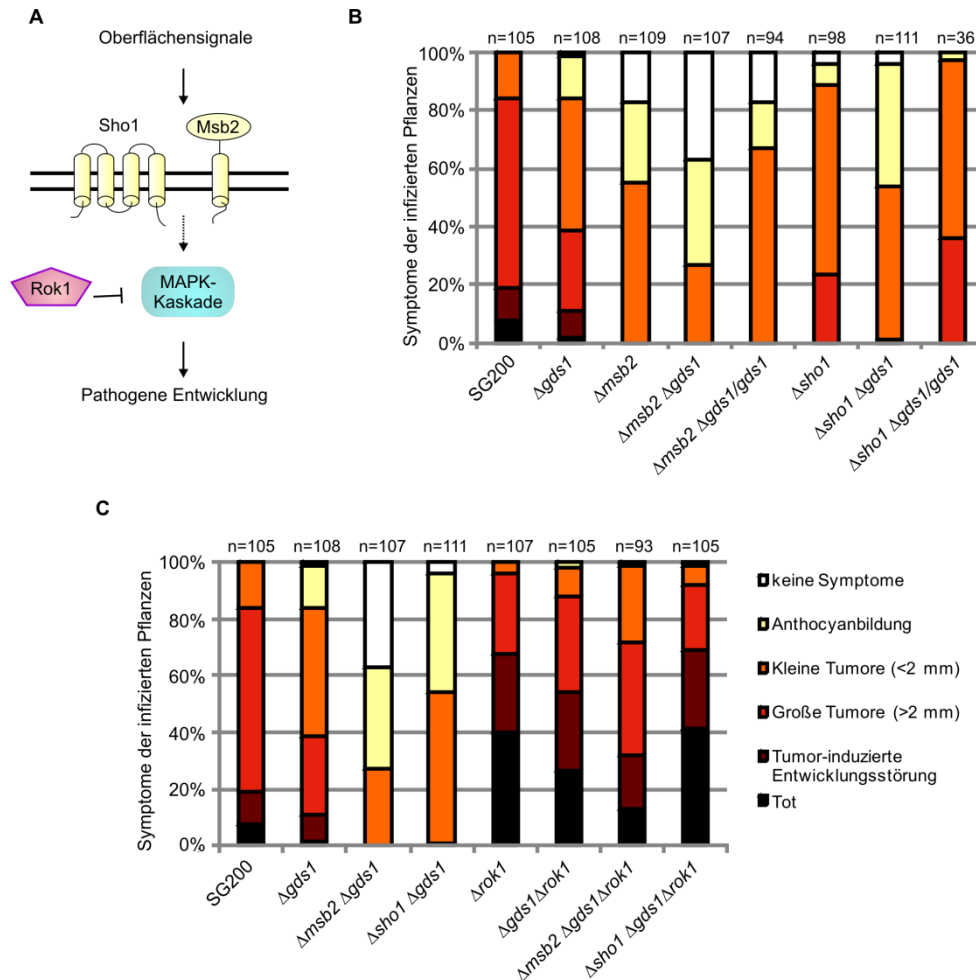


Abbildung 2.8: Die Doppeldeletion von *gds1* und *msb2* bzw. *sho1* weist eine deutlich verminderte Pathogenität auf. Diese kann durch $\Delta rok1$ supprimiert werden. (A) Schematische Darstellung des Sho1 und Msb2 Signalwegs. Sho1 und Msb2 registrieren Signale auf der Zelloberfläche und übertragen diese, auf bisher unbekannte Weise, an die MAPK-Kaskade weiter, was wiederum zur Pathogenitätsentwicklung führt. Durch Dephosphorylierung kann Rok1, eine dual-spezifische Phosphatase, regulatorischen Einfluss auf die MAPK-Kaskade nehmen. **(B)** Untersuchung der Virulenz von *gds1* und *msb2* bzw. *sho1* Doppeldeletionsmutanten. Die Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert und nach 11 Tagen erfolgte die Auswertung der Symptome der einzelnen Pflanzen in 6 Kategorien (Legende). Sowohl die *gds1/msb2* als auch die *gds1/sho1* Doppeldeletionsmutanten zeigen eine stärker reduzierte Virulenz, als die jeweiligen Einzelmutanten. Der beobachtete Effekt kann durch Einbringen von zwei Kopien $P_{gds1}::gds1$ in den *ip*-Lokus komplementiert werden. **(C)** Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit den dargestellten Stämmen infiziert und drei unabhängige Experimente entsprechend (B) ausgewertet. Dargestellt ist das Verhältnis des jeweiligen Phänotyps zur Gesamtzahl infizierter Pflanzen (n). Die Deletion von *rok1* kann sowohl den $\Delta gds1$ Phänotyp als auch die Doppeldeletion von *gds1* und *msb2* bzw. *sho1* supprimieren.

So besitzen rund 55 % der mit SG200 $\Delta msb2$ infizierten Pflanzen kleine Tumore, während es bei der Doppeldeletionsmutante nur noch 27 % der Pflanzen waren. Bei SG200 $\Delta sho1$ infizierten Pflanzen weisen ca. 23 % große Tumore auf, wohingegen es bei SG200 $\Delta sho1 \Delta gds1$ nur 1% war. Dieser Phänotyp kann durch das Einbringen von zwei *gds1*

2. Ergebnisse

Allelen in den *ip*-Lokus wieder komplementiert werden (Abb. 2.8 B). Desweiteren konnte eine Deletion von *rok1* sowohl den $\Delta gds1$ Phänotyp als auch die Doppelmutanten supprimieren (Abb. 2.8 C). Rok1 ist eine dual-spezifische Phosphatase und ist an der negativen Regulation der MAPK-Kaskade beteiligt (Abb. 2.8 A). Eine Deletion von *rok1* führt zu einer Hypervirulenz (Di Stasio et al, 2009). Damit geben die Pathogenitätstests einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von Gds1 oberhalb der MAPK-Kaskade.

2.3 Gds1 wirkt als GEF in *U. maydis*

2.3.1 Gds1 kann Rac1 aktivieren

Da eine biochemische Interaktion von Gds1 mit Ras- bzw. Rho-GTPasen gezeigt werden konnte, und auch das humane Ortholog von Gds1 eine GEF-Aktivität besitzt, sollte überprüft werden, ob Gds1 in *U. maydis* ebenfalls eine GEF-Funktion aufweist. Dafür wurde ein biochemisches Testsystem verwendet, welches die Aktivität und Spezifität von GEFs gegenüber GTPasen bestimmt.

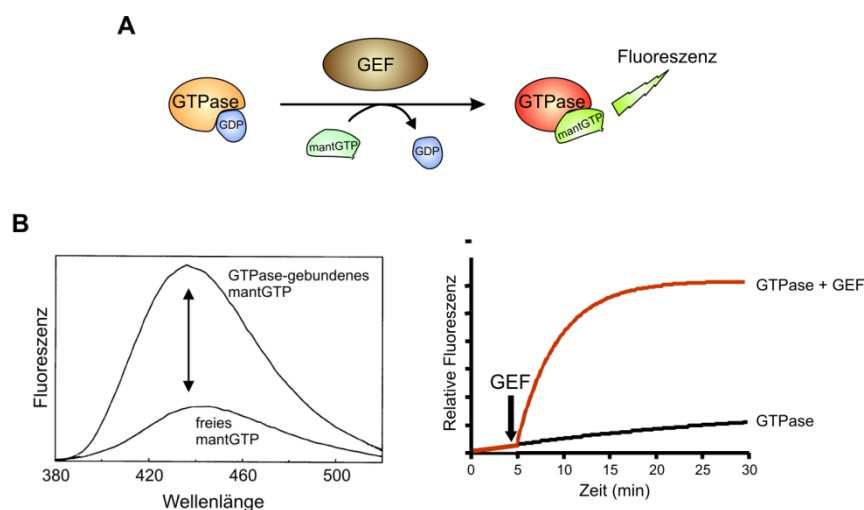


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung eines *in vitro* GEF-Assays. (A) GTPasen können zwischen der inaktiven GDP-gebundenen Form und der aktiven GTP-gebundenen Form wechseln. Der dabei stattfindende Nukleotid-Austausch erfolgt spontan oder kann durch einen GEF (*Guaninnukleotid Exchange Faktor*) katalysiert werden. Ein GEF-Assay macht sich diese Funktion mit Hilfe eines fluoreszierenden GTP Analogs (mantGTP) zu nutze. Handelt es sich um einen für diese GTPase spezifischen GEF, katalysiert dieser die Freisetzung von GDP und das im Überschuss vorhandene mantGTP kann an die nukleotidfreie GTPase binden. **(B)** Freies mantGTP besitzt nur eine geringe Fluoreszenz. Bindet es jedoch an eine GTPase, steigt die Fluoreszenz stark an (linkes Bild). Durch diesen Anstieg der Fluoreszenz kann der Austausch von GDP zu mantGTP direkt gemessen werden. Wird ein Ansatz gemessen, indem nur die GTPase mit Reaktionspuffer vorliegt, kommt es zu einem schwachen Anstieg der Fluoreszenz, welcher auf die Basalaktivität der GTPase zurückzuführen ist und auch bei einem nicht aktivierenden GEF beobachtet wird. Handelt es sich jedoch um einen spezifischen GEF, ist eine starke und schnelle Erhöhung der Fluoreszenz zu registrieren (roter Graph im rechten Bild).

2. Ergebnisse

GTPasen existieren in der inaktiven GDP-gebundenen Form und in der aktiven GTP-gebundenen Form. Der Austausch von GDP zu GTP kann spontan erfolgen oder durch einen GEF katalysiert werden. In einem *in vitro* GEF Assay kann der GDP/GTP Austausch mit Hilfe eines fluoreszierenden GTP Analogs, N-methylantraniloyl-GTP (mantGTP), gemessen werden (Abb. 2.9 A) (Neal et al, 1990). Wie in Abbildung 2.9 B schematisch dargestellt ist, besitzt freies mantGTP nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Bindet es jedoch an eine GTPase, steigt die Fluoreszenz stark an. Wenn in einem GEF-Assay nur die GTPase mit Reaktionspuffer gemessen wird bzw. ein für die GTPase unspezifischer GEF vorliegt, kann man nur einen schwachen Anstieg der Fluoreszenz beobachten. Hierbei handelt es sich um die Basalaktivität der GTPasen, die auf den spontanen Nukleotid-Austausch zurückzuführen ist. Handelt es sich um einen für diese GTPase spezifischen GEF, erfolgt ein sehr schneller und starker Anstieg der Fluoreszenz.

Für die GEF-Assays wurden zunächst rekombinante GST fusionierte Proteine von Gds1 und den Ras/Rho-GTPasen in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie an Glutathion Sepharose aufgereinigt (Abb. 2.10). GST-Cdc42 und GST-Rac1 wurde bereits von Britta Tillmann aufgereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Außer GST-Ras1 zeigen alle GST-fusionierten Proteine eine prominente Bande. Neben diesen Banden sind zudem Abbaubanden und unspezifische *E. coli* Proteine zu erkennen.

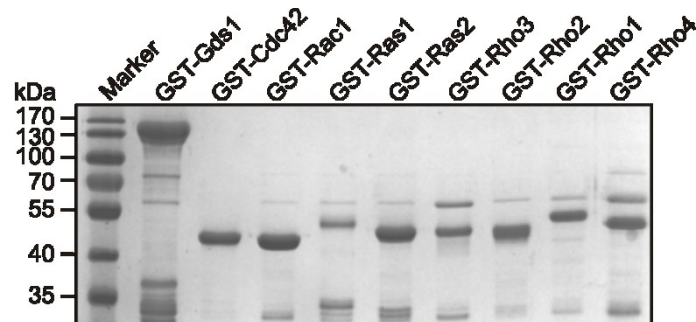


Abbildung 2.10: Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen von Gds1 und kleinen GTPasen aus *E. coli*. Die GST-fusionierten Proteine Gds1 (130 kDa), Cdc42 (48 kDa), Rac1 (48 kDa), Ras1 (51 kDa), Ras2 (49 kDa), Rho1 (52 kDa), Rho2 (50 kDa), Rho3 (49 kDa) und Rho4 (49 kDa) wurden in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Glutathion Sepharose aufgereinigt. Die isolierten Proteine wurden mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Neben den GST-fusionierten Proteinen sind noch Abbaubanden und einige unspezifische *E. coli* Proteine zu erkennen.

Frühere Untersuchungen in anderen Organismen zeigten, dass SmgGDS sowohl Rho-GTPasen, wie beispielsweise Rac1 und Cdc42, als auch Ras-GTPasen aktivieren kann (Hiraoka et al, 1992; Isomura et al, 1990; Yaku et al, 1994; Yamamoto et al, 1990). Da die $\Delta gds1$ Mutante eine verzögerte Filamentbildung aufweist und Rac1 ein essentielles Protein

2. Ergebnisse

für das filamentöse Wachstum ist, erfolgte zunächst ein GEF-Assay mit Rac1 und der nahe verwandten GTPase Cdc42.

Hierfür wurde das GDP Analog mantGDP im Reaktionspuffer mit GST-Rac1 bzw. GST-Cdc42 inkubiert und die Fluoreszenz in Minutenschritt gemessen. Nach 5 min Equilibrierungsphase wurde GST-Gds1 bzw. Puffer, welcher als Negativkontrolle (Basalaktivität) dient, hinzugegeben und weitere 60 min gemessen. Neben der Basalaktivität, die ein Indiz für die Aktivität der GTPase ist, wurde als positive Kontrolle EDTA zugefügt. EDTA ist ein Chelator, welcher der GTPase die Mg^{2+} -Ionen entzieht, wodurch es zur vorübergehenden Freisetzung des gebundenen Nukleotids kommt. Die nun nukleotidfreie GTPase kann dann das im Überschuss vorhandene mantGDP binden. Abbildung 2.11 A zeigt, dass nach Zugabe von Gds1 zum Reaktionsansatz von Rac1 ein schneller Anstieg der Fluoreszenz stattfindet. Dies deutet darauf hin, dass Gds1 den Nukleotid-Austausch von Rac1 katalysieren kann. Dies lässt schlussfolgern, dass Gds1 aus *U. maydis* eine GEF-Aktivität besitzt.

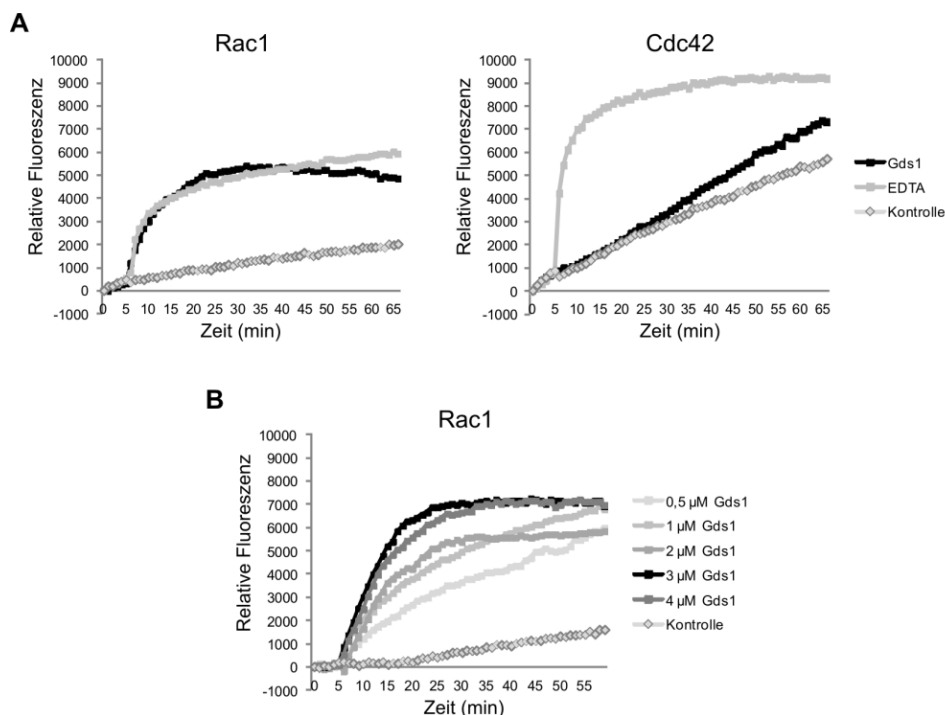


Abbildung 2.11: Gds1 ist ein Rac1 GEF. (A) Gds1 *in vitro* GEF-Assays mit den GTPasen Cdc42 und Rac1. Als Kontrollen wurden Fluoreszenzmessungen in Puffer mit GTPase (negativ) sowie eine Positivkontrolle mit EDTA durchgeführt. Die Analyse zeigt, dass Gds1 den Nukleotid-Austausch von Rac1 katalysieren kann, jedoch nicht von Cdc42. (B) Bestimmung der optimalen Gds1 Konzentration im GEF-Assay. In einem GEF-Assay mit 1 µM Rac1 wurden verschiedene Konzentrationen (0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM und 4 µM) von Gds1 eingesetzt. Es konnte beobachtet werden, dass ab einer Konzentration von 3 µM Gds1 die Sättigung von GTPase mit mantGDP am schnellsten erreicht wird. Als Kontrolle wurde die GTPase nur mit Puffer gemessen.

2. Ergebnisse

Im Vergleich zum Rac1-Ansatz ähnelt der Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe von Gds1 zu Cdc42 dem der Basalaktivität von Cdc42. Nur durch Zugabe von EDTA ist ein schneller Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Das beweist, dass Gds1 Cdc42 nicht aktiviert. Im gleichen Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Gds1 auch die humane Rac1-GTPase aktivieren kann (Daten nicht dargestellt).

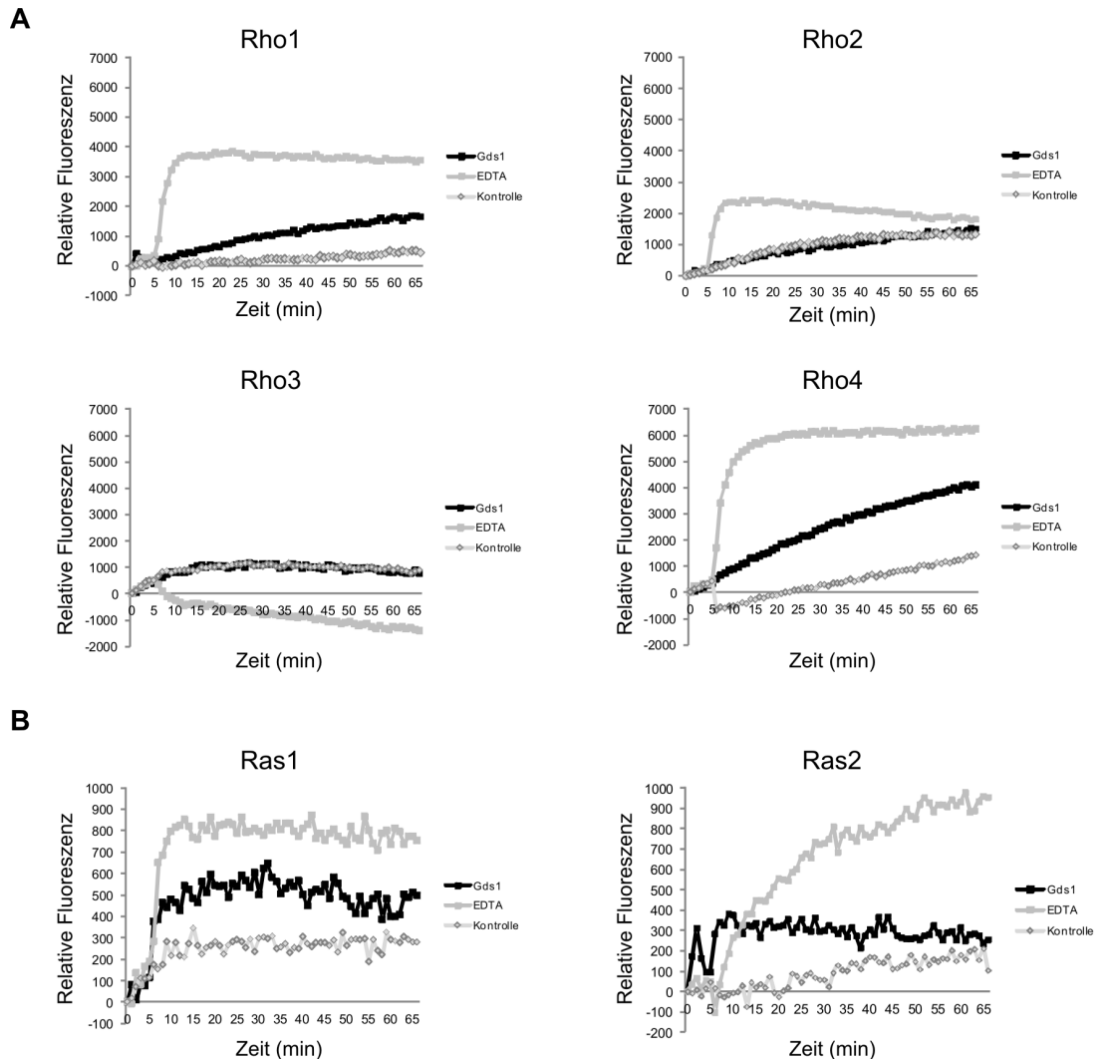


Abbildung 2.12: In vitro GEF-Assays von Gds1 mit Rho- und Ras-GTPasen. (A) Überprüfung der Gds1 vermittelten Aktivierung der GTPasen Rho1, Rho2, Rho3 und Rho4. Gds1 zeigt eine schwache Aktivierung von Rho1 und Rho4, hat aber keinen Effekt auf Rho2 und Rho3. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass bei Anwesenheit von Rho3 die Zugabe von EDTA zu einem starken Sinken der Fluoreszenz führt. **(B)** Neben den Rho-GTPasen wurden auch die Ras-GTPasen, Ras1 und Ras2, in einem GEF-Assay mit Gds1 getestet. Die relative Fluoreszenz ist schwach, was auf eine geringere Aktivität der GTPase hinweist. Die Analysen zeigen, dass Gds1 den Nukleotid-Austausch von Ras2 nicht katalysieren, aber Ras1 schwach aktivieren kann.

Da Gds1 ein GEF ist, sollten im Weiteren die Bedingungen der GEF-Assays verbessert werden, indem die effektivste GST-Gds1 Konzentration bestimmt wird. Hierfür wurden in

2. Ergebnisse

einem GEF-Assay mit Rac1 verschiedene Konzentrationen von GST-Gds1 eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass ab einer Konzentration von 3 μ M GST-Gds1 die Sättigung der GTPase mit mantGDP am schnellsten erreicht wird (Abb. 2.11 B). In allen folgenden GEF-Assays wurden daher immer 3 μ M GST-Gds1 eingesetzt.

In vitro GEF-Assays mit humanen SmgGDS haben gezeigt, dass SmgGDS ein spezifischer GEF für RhoA und RhoC ist. Desweiteren konnte in diesen Studien beobachtet werden, dass die GTPasen Cdc42, Rac1, Rac2, RhoB, K-Ras, Rap1a und Rap1b nicht von SmgGDS aktiviert werden können (Hamel et al, 2011). Deshalb wurde überprüft, ob *U. maydis* Gds1 auch Rho Homologe aktivieren kann. Abbildung 2.12 A stellt dar, dass Gds1 sowohl Rho1 als auch Rho4 schwach aktivieren kann, jedoch nicht die GTPasen Rho2 und Rho3. Interessanterweise konnte bei der Zugabe von EDTA zu Rho3 ein rasanter Abfall der Fluoreszenz beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die GTPase durch das Fehlen von Mg^{2+} -Ionen instabil wird.

Da Gds1 *in vitro* auch mit den Ras-GTPasen interagieren konnte, wurden die GTPasen Ras1 und Ras2 ebenfalls auf Aktivierung durch Gds1 getestet. Aufreinigungen von GST-Ras1 und GST-Ras2 und anschließende GEF-Assays mit den GEFs Sql2 bzw. Tfh1 zeigten, dass die Ras Proteine nur eine geringe Löslichkeit besitzen und die Aktivität dieser Proteine sehr schwach ist (persönliche Mitteilung A. Bauer). Auch in dieser Arbeit konnten starke Schwankungen bei den GEF-Assays von Ras1 und Ras2 mit Gds1 beobachtet werden und es kann daher nur vermutet werden, dass Gds1 Ras1 schwach aber Ras2 nicht aktivieren kann (Abb. 2.12 B).

2.3.2 Gds1 benötigt die ersten 157 Aminosäuren von Rac1 für die spezifische Aktivierung

Da Gds1 ein Rac1 spezifischer GEF ist, sollte überprüft werden, welche Proteinregion von Rac1 wichtig für die Spezifitätsdetermination von Gds1 ist (in Zusammenarbeit mit Britta Tillmann). Obwohl Cdc42 und Rac1 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit besitzen, sind sie für unterschiedliche Zellfunktionen in *U. maydis* wichtig und werden dabei spezifisch von verschiedenen GEFs reguliert. So ist Rac1 für das polare Wachstum essentiell und wird durch den Rac1-spezifischen GEF Cdc24 aktiviert (Hlubek, 2008; Mahler et al, 2006). Für die Regulation von Cdc42 wiederum sind mehrere GEFs bekannt, zum Beispiel katalysiert Don1 den Nukleotid-Austausch von Cdc42 während der Zelltrennung (Hlubek et al, 2008; Mahler et al, 2006). Frühere Studien, sowohl in humanen System als auch in *U. maydis*,

2. Ergebnisse

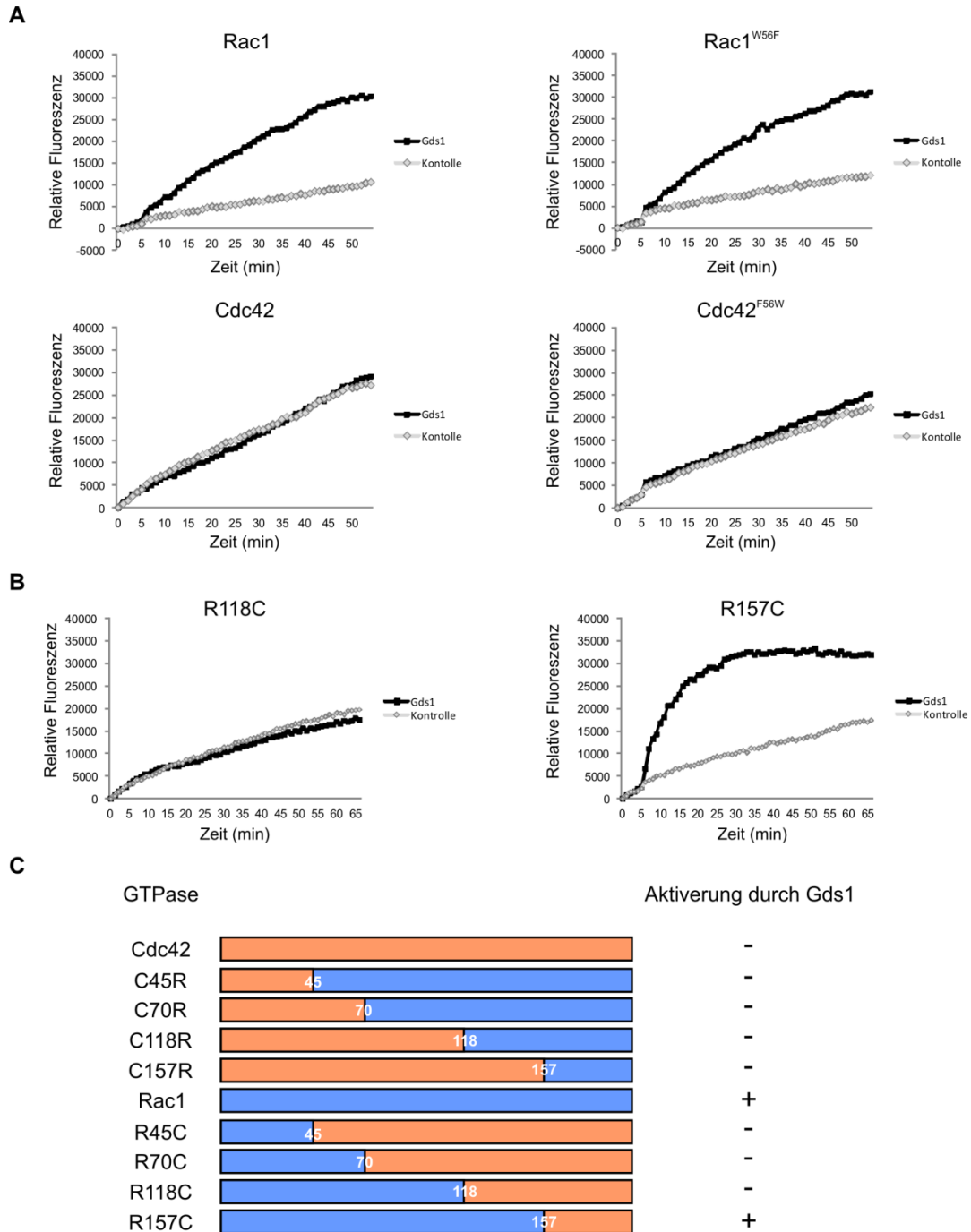


Abbildung 2.13: Untersuchung der Rac1-Gds1 Interaktionsregion. (A) GEF-Assays mit den beiden Mutanten Rac1^{W56F} und Cdc42^{F56W} wurden durchgeführt, um die für die spezifische Interaktion beschriebene Wichtigkeit der Aminosäuren an Position 56 zu testen (Gao et al, 2001; Hlubek et al, 2008; Karnoub et al, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure an Position 56 keinen Effekt auf die Spezifitätsbestimmung von Gds1 hat. Als Kontrolle für die Basalaktivität der GTPase wurde die Fluoreszenz ohne GEF bestimmt. (B) Um die spezifische Interaktionsregion von Rac1 einzugrenzen, wurden verschiedene chimäre GTPasen von Rac1 und Cdc42 hergestellt und hinsichtlich ihrer Aktivierung durch Gds1 getestet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die ersten 118 As von Rac1 nicht ausreichen, um durch Gds1 aktiviert zu werden. Gds1 benötigt die ersten 157 As von Rac1, um diese GTPase zu aktivieren. (C) Zusammenfassung der GEF-Assays von Gds1 mit den chimären GTPasen.

2. Ergebnisse

haben gezeigt, dass die Aminosäure an Position 56 kritisch für GEFs der Dbl-Familie bei der Unterscheidung zwischen Rac1 und Cdc42 ist (Gao et al, 2001; Hlubek et al, 2008; Karnoub et al, 2001). In allen Rac1 bekannten Proteinen ist diese Aminosäure ein Tryptophan während es in Cdc42 ein Phenylalanin ist. Tauscht man in Rac1 das Tryptophan gegen ein Phenylalanin aus, kann Cdc24 die Rac1^{W56F}-GTPase nur noch sehr schwach aktivieren kann. Don1, welches den Nukleotid-Austausch von Rac1 nicht katalysiert, zeigt dagegen eine sehr gute Aktivierung von Rac1^{W56F} (Hlubek et al, 2008). Die Aminosäure an Position 56 zeigt sich jedoch nicht für jeden GEF der Dbl-Familie als kritisch. So konnte für den GEF Hot1 gezeigt werden, dass dieser über eine andere Spezifitätsbestimmung verfügt (Tillmann, 2013). Basierend auf diesen Studien sollte überprüft werden, ob die Aminosäure an Position 56 für die Aktivierung durch Gds1 wichtig ist. Daher wurden Gds1 GEF-Assays mit Rac1, Rac1^{W56F}, Cdc42 und Cdc42^{F56W} durchgeführt. Gds1 kann sowohl Rac1 als auch Rac1^{W56F} aktivieren, jedoch nicht Cdc42 und Cdc42^{F56W} (Abb. 2.13 A). Dies zeigt, dass die Aminosäure an Position 56 keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination von Gds1 zu haben scheint.

Da diese Ergebnisse keine Rückschlüsse darauf geben, welche Region von Rac1 wichtig für die Aktivierung durch Gds1 ist, wurden verschiedene chimäre GTPasen mit Gds1 getestet. Die Herstellung der aus Rac1 und Cdc42 bestehenden Chimären erfolgte durch Britta Tillmann. Hierbei wurde die Fragmentgrenze jeweils so gewählt, dass sie in Regionen mit hoher Homologie lag, um die Struktur der Proteine so gering wie möglich zu beeinträchtigen. In den GEF-Assays konnte gezeigt werden, dass eine GTPase, die aus den ersten 118 Aminosäuren von Rac1 besteht, nicht von Gds1 aktiviert werden kann. Besitzt die GTPase jedoch die ersten 157 Aminosäuren von Rac1, findet ein schneller Nukleotid-Austausch mit Hilfe von Gds1 statt (Abb. 2.13 B). Abbildung 2.13 C zeigt eine Zusammenfassung der getesteten chimären GTPasen. Bis auf Rac1 und R157C konnten alle anderen GTPasen nicht von Gds1 aktiviert werden. Dies deutet darauf hin, dass die ersten 157 Aminosäuren von Rac1 für die Spezifitätsdetermination von Gds1 wichtig sind.

2.3.3 Gds1^{N600A R603A} kann Rac1 nicht mehr aktivieren

Da nun die interagierende Region von Rac1 bekannt war, sollte geklärt werden, welche Aminosäuren bzw. Region von Gds1 essentiell für die GEF-Funktion sind. Von humanem SmgGDS konnten Mutanten hergestellt werden, die eine verminderte GEF-Aktivität gegenüber RhoA hatten (unter anderem SmgGDS^{M307A}) bzw. sogar zu einem kompletten Aktivitätsverlust führten (SmgGDS^{N343A R346A} und SmgGDS^{N388A}) (Hamel et al, 2011).

2. Ergebnisse

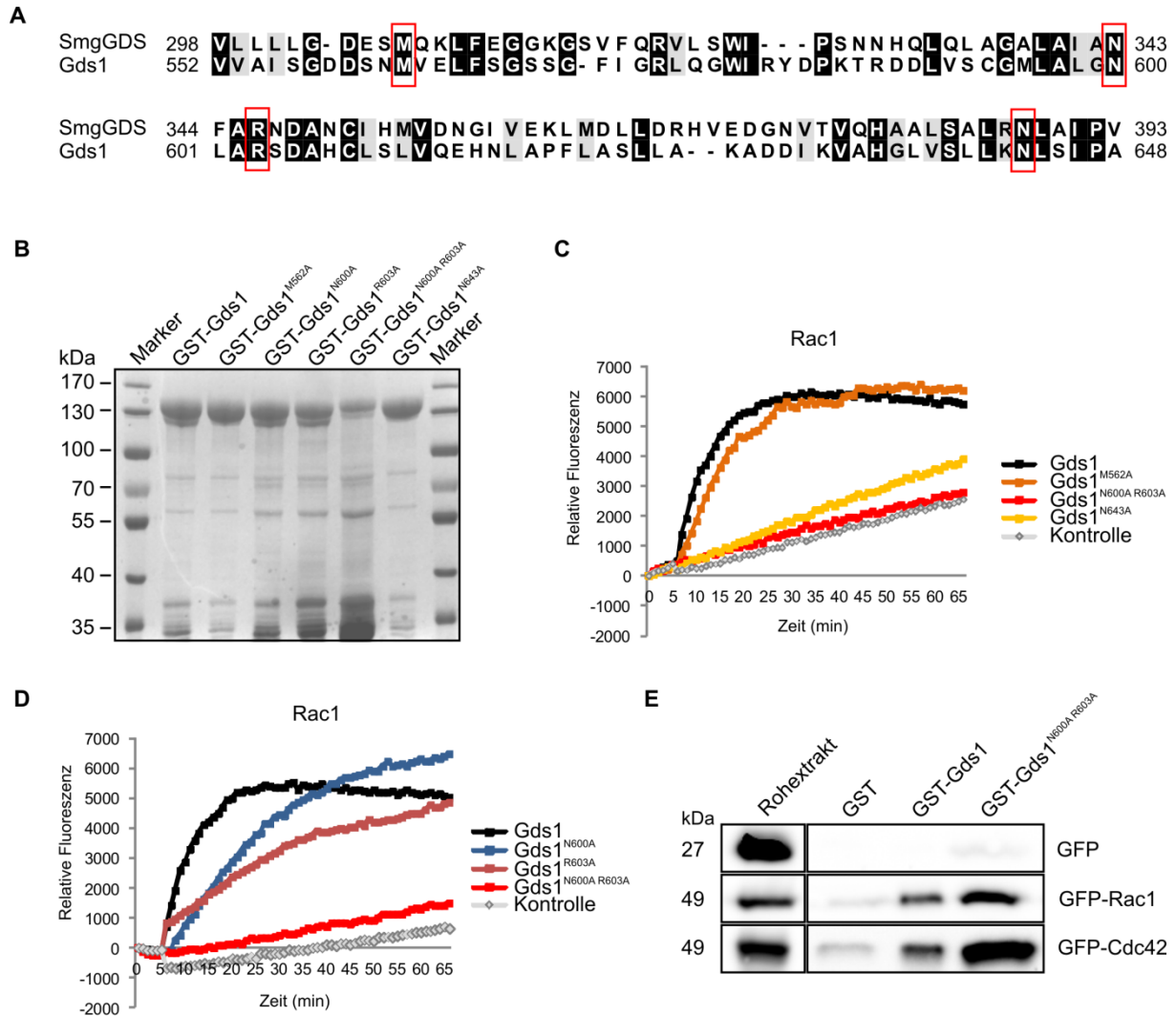


Abbildung 2.14: Die Doppelmutation von N600A und R603A führt zum Verlust der GEF-Aktivität von Gds1. (A) Ausschnitt eines Sequenzvergleichs von SmgGDS (*H. sapiens*) und Gds1 (*U. maydis*). Aminosäuren von SmgGDS, die einen Einfluss auf die GEF-Aktivitäten zeigten (Hamel et al, 2011), sind auch in Gds1 von *U. maydis* konserviert (rote Kästchen). (B) Aufreinigung von GST fusionierten Gds1 und Gds1-Mutanten aus *E. coli*. Die Proteine wurden mit Hilfe von Affinitätschromatographie (Glutathion Sepharose) aufgereinigt und mittels SDS-PAGE visualisiert. Neben den jeweiligen GST fusionierten Proteinen sind teilweise Abbauprodukte sowie unspezifische *E. coli* Banden zu erkennen, welche besonders bei GST-Gds1^{N600A R603A} auffallen und auf eine geringe Stabilität deuten. (C) *In vitro* GEF-Assay von Rac1 mit verschiedenen Gds1 Mutanten. Da GST-Gds1^{N600A R603A} instabil ist, wurde die doppelte Konzentration eingesetzt. Gds1^{M562A} zeigt im Gegensatz zu Gds1^{N643A} keine abgeschwächte Aktivität, wohingegen die Doppelmutation N600A R603A zum Verlust der GEF-Aktivität führt. Als Kontrolle für den spontanen Nukleotid-Austausch wurde die GTPase nur mit Puffer gemessen. (D) Einzelmутanten der beiden Aminosäurereste wurden mittels GEF-Assay getestet. Es zeigt sich, dass beide Mutationen benötigt werden. (E) Mittels GST-Kopräzipitation wurde überprüft, ob GST-Gds1^{N600A R603A} weiterhin mit Rac1 bzw. Cdc42 interagieren kann. GST-Gds1 und GST-Gds1^{N600A R603A} wurden an Glutathion Sepharose Beads gebunden und mit *U. maydis* Proteinextrakt (GFP-Rac1 bzw. GFP-Cdc42 Überexpression) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE. Western Blot und anschließende Analyse mit anti-GFP Antikörpern konnte zeigen, dass GST-Gds1^{N600A R603A} mit Rac1 und Cdc42 interagiert. Als Negativkontrolle diente GFP.

2. Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren auch in Gds1 von *U. maydis* konserviert sind, erfolgte eine Sequenzanalyse. In Abbildung 2.14 A ist dargestellt, dass alle vier Aminosäuren in *U. maydis* ebenfalls vorhanden sind. Daher wurden die Konstrukte *gds1*^{M562A}, *gds1*^{N600A R603A} und *gds1*^{N643A} hergestellt (siehe Material und Methoden Abschnitt 4.1.6). Nach Expression von Gds1 und dessen Derivaten in *E. coli* wurden diese Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend fand eine Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE und folgender Coomassie-Brillantblau Färbung statt. Neben den GST-Fusionsproteinen konnten auch Abbaubanden und unspezifische *E. coli* Banden beobachtet werden (Abb. 2.14 B). Besonders GST-Gds1^{N600A R603A} zeigt eine schwächere Proteinbande, aber deutlich mehr Abbaubanden, was vermuten lässt, dass dieses Protein sehr instabil ist. Wegen dieser Instabilität wurde in den Untersuchungen die doppelte Menge von GST-Gds1^{N600A R603A} benutzt. Die GEF-Analysen mit Rac1 und Gds1 bzw. deren Mutanten zeigten, dass der Austausch von Methionin an Position 652 zu Alanin keine Auswirkung auf die GEF-Aktivität von Gds1 hat. Der Austausch von Asparagin 643 zu Alanin hingegen führt zu einer verminderten Aktivierung von Rac1. Der Austausch von Asparagin und Arginin an den Positionen 600 und 603 jeweils zu Alanin führt zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (Abb. 2.14 C). Um zu überprüfen, ob schon die Einzelmутanten von Gds1^{N600A R603A} ausreichend für den Verlust der GEF Funktion sind, wurden diese in GEF-Assays mit Rac1 getestet. Es stellte sich heraus, dass beide Mutanten in der Lage waren, den Nukleotidaustausch von Rac1 zu katalysieren. Demzufolge müssen für einen Aktivitätsverlust beide Aminosäuren mutiert werden. Beide spielen jedoch eine Rolle für die GEF-Aktivität, was die jeweils reduzierte Startaktivität der Einzelmутanten zeigt.

Mit Hilfe einer GST-Kopräzipitation sollte ausgeschlossen werden, dass der Funktionsverlust von Gds1^{N600A R603A} auf eine Störung der Interaktion mit Rac1 zurückzuführen ist. Die aufgereinigten GST, GST-Gds1 und GST-Gds1^{N600A R603A} wurden an Glutathion Sepharose Beads gebunden und diese mit Proteinextrakten aus *U. maydis* Stämmen, in denen die GFP-markierten Proteine überexprimiert wurden, inkubiert. Abbildung 2.14 D zeigt, dass Gds1^{N600A R603A} sowohl mit Rac1 als auch mit Cdc42 interagieren kann. Dies beweist, dass der Funktionsverlust von Gds1^{N600A R603A} nicht auf einer Störung in der Interaktionsfähigkeit mit Rac1 beruht.

2.4 Die GEF-Aktivität von Gds1 ist wichtig für das filamentöse Wachstum

2.4.1 Die Überexpression von Gds1 hat keinen Einfluss auf die Zellmorphologie

Basierend auf dem Ergebnis, dass Gds1 ein spezifischer Rac1-GEF ist, wurde vermutet, dass die Überexpression von Gds1, aufgrund der Rac1 Aktivierung, zu einer morphologischen Veränderung der Zellen führt. So induziert der Rac1-GEF Cdc24 bei Überexpression das filamentöse Wachstum (Frieser et al, 2011). Um dies zu überprüfen, wurde der Arabinose-induzierbare *crg*-Promotor am genomischen Locus von *gds1* mittels homologer Rekombination integriert. Nach 4 Stunden Überexpression von Gds1 konnten keine morphologische Veränderung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 2.15 A). Diese Beobachtung konnte auch nach weiteren 12 Stunden Inkubation unter Arabinosebedingungen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

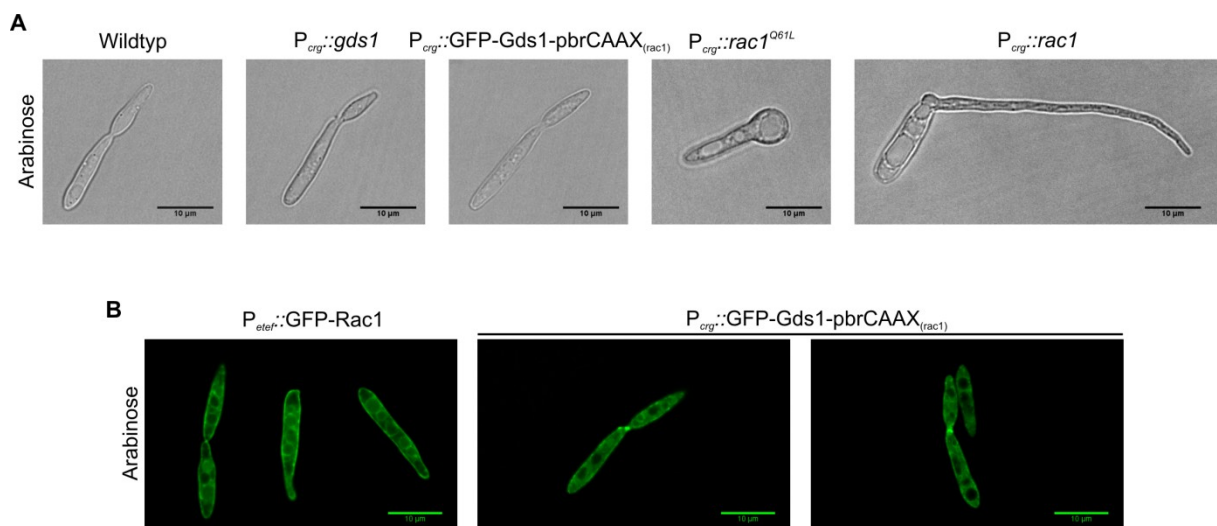


Abbildung 2.15: Überexpression von Gds1 bzw. GFP-Gds1-pbrCAAX_(rac1) zeigt keinen morphologischen Defekt (A) Analyse des Phänotyps bei einer Überexpression von Gds1 bzw. GFP-Gds1-pbrCAAX_(rac1). Die Kulturen wurden in YEPSL Medium angezogen und anschließend zur Induktion in YEP Medium (2 % Arabinose) weitere 4 Stunden bei 28 °C inkubiert. Sowohl die Überexpression von Gds1 als auch die von GFP-Gds1-pbrCAAX_(rac1) zeigen keine Veränderung des Phänotyps. Zum Vergleich wurde auch die Überexpression von konstitutiv aktiven Rac1^{Q61L} und Rac1 gezeigt, was zum Aufblähen der Zellen bzw. zur Filamentbildung führt. **(B)** Untersuchung der Lokalisation von GFP-Gds1-pbrCAAX_(rac1) und GFP-Rac1. Die Konstrukte wurden in den *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert. GFP-Rac1 steht unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotor und GFP-Gds1-pbrCAAX_(rac1) unter dem regulierbaren *crg* Promotor. Die Kulturen wurden zur Induktion für 4 Stunden in YEP Medium (2 % Arabinose) bei 28 °C inkubiert und dann mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Beide Proteine lokalisieren an der Plasmamembran, im Cytoplasma und an den Septen.

2. Ergebnisse

Mögliche Erklärungen, warum eine Überexpression von Gds1 keine morphologischen Veränderungen zeigen, könnten sein, dass Gds1 durch andere Proteine reguliert wird oder eine unterschiedliche Lokalisation zu Rac1 besitzt. Daher wurde an das C-terminale Ende von Gds1 eine polybasische Region mit dem CAAX-Motiv von Rac1 fusioniert. Dies führt zu einer Membranassoziation aufgrund der posttranslationalen Modifikation des Cysteins. Zudem wurde eine N-terminale GFP-Fusion erstellt, um die Lokalisation von Gds1pbrCAAX_(rac1) in der Zelle zu bestimmen. Das resultierende Konstrukt wurde in den *ip*-Lokus von Bub8 integriert. Die Überexpression von Wildtyp Rac1 führt zu einer verstärkten Filamentbildung wohingegen die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 (Rac1^{Q61L}) zu einem Aufblähen der Zelle führt (Mahlert et al, 2006) (Abb. 2.15 A). Da davon ausgegangen werden kann, dass GFP-Gds1pbrCAAX_(rac1) die gleiche Lokalisation wie GFP-Rac1 aufweist, ist entweder eine Filamentbildung bzw. ein Aufblähen der Zelle zu erwarten, da Rac1 überall in der Zelle aktiviert werden könnte. Interessanterweise zeigt auch die Überexpression von GFP-Gds1pbrCAAX_(rac1) keine morphologischen Defekte (Abb. 2.15 A). Um zu kontrollieren, ob die Lokalisation von GFP-Rac1 und GFP-Gds1pbrCAAX_(rac1) tatsächlich ähnlich ist, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 2.15 B deutet daraufhin, dass beide Proteine an der Plasmamembran, im Cytoplasma und an den Septen lokalisieren.

2.4.2 Gds1^{N600A R603A} kann den verzögerten Filamentphänotyp einer $\Delta gds1$ Mutante nicht komplementieren

In vitro konnte gezeigt werden, dass Gds1 eine GEF-Aktivität besitzt. Jedoch weist die Überexpression von Gds1 keinen veränderten Phänotyp auf. Daher stellte sich die Frage, ob Gds1 *in vivo* als GEF wirkt und zumindest das verzögerte filamentöse Wachstum einer $\Delta gds1$ Mutante vielleicht auf das Fehlen der GEF-Aktivität zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen, wurde die Gds1^{N600A R603A} Mutante verwendet, da diese mit Rac1 interagieren kann, jedoch keine GEF-Aktivität mehr aufweist. Dabei wurde das unter der Kontrolle des *gds1* Promotor stehende *gds1*^{N600A R603A} Allel zweimal in den *ip*-Lokus von SG200AN $\Delta gds1$ integriert und auf Aktivkohle-PD Platten die Filamentbildung untersucht. Abbildung 2.16 zeigt, dass die Filamentbildung bei SG200AN $\Delta gds1$ P_{*gds1*}::*gds1*^{N600A R603A} etwas stärker ist als bei SG200AN $\Delta gds1$. Im Vergleich zu SG200AN $\Delta gds1$ P_{*gds1*}::*gds1* kann aber SG200AN $\Delta gds1$ P_{*gds1*}::*gds1*^{N600A R603A} den reduzierten Filamentphänotyp einer $\Delta gds1$ Mutante nicht komplementieren. Trotz mehrfacher Integration von P_{*gds1*}::*gds1*^{N600A R603A}

2. Ergebnisse

gelang es nicht, den $\Delta gds1$ Phänotyp zu komplementieren (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die GEF-Aktivität von Gds1 für das filamentöse Wachstum wichtig ist.

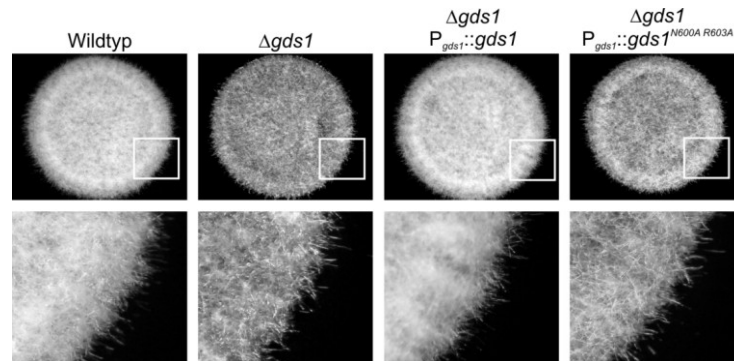


Abbildung 2.16: Die GEF Aktivität von Gds1 wird für das filamentöse Wachstum benötigt. Das GEF inaktive $gds1^{N600A R603A}$ Allel wurde ektopisch in den *ip*-Lokus von SG200 AN $\Delta gds1$ integriert und die Filamentbildung mittels Aktivkohle-PD Platten analysiert. Die untere Bildreihe stellt vergrößerte Bildausschnitte der jeweiligen Kolonie der oberen Bildreihe dar. Der deutlich erkennbare Phänotyp der $\Delta gds1$ Mutante kann durch das $gds1^{N600A R603A}$ Allel nicht komplementiert werden.

2.4.3 Die chimäre GTPase R118C zeigt ebenfalls einen reduzierten Filamentphänotyp

Hinsichtlich der Notwendigkeit der GEF-Aktivität von Gds1 für das filamentöse Wachstum sollte im Folgenden mit Hilfe der chimären GTPase R118C, welche nicht mehr von Gds1 aktiviert werden kann, überprüft werden, ob Gds1 den Nukleotid-Austausch von Rac1 katalysiert. Hierfür wurde das *r118c* Allel mittels homologer Rekombination mit dem *rac1* Gen im Bub8 und Bub8 $\Delta gds1$ Stammhintergrund ausgetauscht und unter die Kontrolle des *crg* Promotors gebracht. Aktiviert Gds1 Rac1 während des filamentösen Wachstums, ist zu erwarten, dass die Überexpression von R118C einen ähnlichen Filamentphänotyp wie der induzierte Stamm Bub8 P_{crg}::*rac1* $\Delta gds1$ hat. Würde bei einer Überexpression von R118C in einer $\Delta gds1$ Mutante noch eine stärkere Reduktion des Filaments beobachtet werden als mit dem *gds1* Allel, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Gds1 neben der Aktivierung von Rac1 eine weitere Aktivierung bzw. Funktion während des filamentösen Wachstums besitzt. Untersuchungen mittels Aktivkohle-CM Platten (2 % Arabinose) ergaben, dass eine Überexpression von R118C allein und im $\Delta gds1$ Hintergrund im Vergleich zur Überexpression von Rac1 eine reduzierte Filamentbildung zeigt, ähnlich der von P_{crg}::*rac1* $\Delta gds1$ (Abb. 2.16). Nach zwei Tagen Induktion konnte beobachtet werden, dass es zu einem Stagnieren der Filamentbildung in dem überexprimierten R118C Stämmen gekommen ist, was auf eine verminderte Filamentbildung hindeutet (Daten nicht gezeigt).

2. Ergebnisse

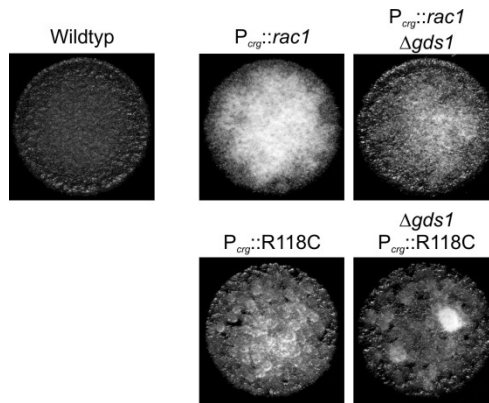


Abbildung 2.17: Die Überexpression der chimären R118C GTPase zeigt im Vergleich zur Überexpression von Rac1 eine reduzierte Filamentbildung. Ein Tropfstest von Bub8, Bub8 $P_{crg}::rac1$, Bub8 $P_{crg}::R118C$ und den $\Delta gds1$ Deletionsmutanten auf Aktivkohle-CM Platten (2 % Arabinose) wurde nach 16 h Inkubation bei 20 °C fotografiert. *rac1* wurde im genomischen Lokus gegen die *crg* Promotor gesteuerte chimäre GTPase R118C ausgetauscht. Sowohl Bub8 $P_{crg}::R118C$ also auch Bub8 $P_{crg}::R118C \Delta gds1$ zeigen eine schwächere Filamentbildung als Bub8 $P_{crg}::rac1$.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass nach 4 Stunden Induktion rund 60 % der Zellen einer R118C Überexpression mit und ohne *gds1* eine Filamentlänge von unter 40 μm aufweisen, während es bei Rac1 mit und ohne *gds1* ca. 41 % waren (Tab. 1). Rund 48 % der Zellen bei einer Rac1 Überexpression zeigten Filamente länger als 40 μm und im $\Delta gds1$ Hintergrund waren es ca. 32 %. Dagegen weisen bei einer Induktion von R118C nur ca. 22 % der Zellen eine Filamentlänge von 40 μm auf. Außerdem konnte bei einer Überexpression von R118C dickere Filamente als bei Wildtyp Rac1 beobachtet werden, was vielleicht ein Hinweis sein könnte, dass R118C nicht alle Funktion von Rac1 übernehmen kann (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 1: Quantifizierung des Anteils an Zellen ohne und mit Filamenten vier Stunden nach Induktion der Rac1 bzw. R118C Überexpression. Die Stämme wurden nach 4 h Induktion in YNB Medium (Arabinose) mikroskopiert und die Filamentlänge (ImageJ) sowie der jeweilige Anteil als Mittelwert (Excel) ermittelt.

	Prozentualer Mittelwert			
Filamentlänge (μm)	$P_{crg}::rac1$ (n=859)	$P_{crg}::rac1 \Delta gds1$ (n=674)	$P_{crg}::R118C$ (n=845)	$\Delta gds1 P_{crg}::R118C$ (n=871)
keine	11,22 \pm 6,71	27,07 \pm 11,42	18,57 \pm 9,28	11,7 \pm 4,51
<40	40,76 \pm 5,23	41,00 \pm 10	60,47 \pm 11,12	63,77 \pm 8,32
41-80	35,08 \pm 7,43	27,38 \pm 6	17,38 \pm 9,7	23,04 \pm 5,6
>81	12,95 \pm 7,23	4,55 \pm 3,88	3,59 \pm 4,28	1,5 \pm 1,47

2.5 Analyse der Rho-GTPase interagierenden Exocyst-Komponenten Exo70 und Sec3

2.5.1 Untersuchung der Funktion von Exo70 in *U. maydis*

Während des filamentösen Wachstums spielen neben den spezifischen GEFs, wie z.B. Gds1 und Cdc24, auch die Effektoren der GTPasen eine entscheidende Rolle. So führt die Deletion des Rac1-Effektors *cla4* zu einem starken Polaritätsdefekt (Leveleki et al, 2004). Die Landmarkproteine des sogenannten Exozyst-Komplexes konnten in *S. cerevisiae* ebenfalls als Effektoren von Cdc42, Rho1 und Rho3 beschrieben werden (Guo et al, 2001; Wu et al, 2010; Zhang et al, 2001). Dieser Komplex besteht neben den Landmark-Proteinen Sec3 und Exo70 aus 6 weiteren Proteinen (Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15 und Exo84), welche durch die Rab-GTPase Sec4 an sekretorische Vesikel binden und an die Spitze transportiert werden, wo sie mit Sec3/Exo70 interagieren (He & Guo, 2009; Lipschutz & Mostov, 2002). Demzufolge markiert der Exozyst-Komplex die Stelle an der Membran, wo aktive Exozytose stattfinden soll und hilft bei der Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran. Auch in *U. maydis* existieren alle acht Homologe der Untereinheiten des Exozyst-Komplexes. *In vitro* Analysen konnten bestätigen, dass die Rho-GTPasen (Cdc42 und Rac1) ebenfalls mit Sec3 bzw. Exo70 interagieren (Schink, 2010) (Daten nicht gezeigt). In früheren Studien konnte zudem in Zusammenarbeit mit Kay Oliver Schink gezeigt werden, dass Sec3 und Exo70 wie erwartet an der wachsenden Spitze lokalisieren, wo aktive Exozytose stattfindet (Abb. 2.18 A). Werden *sec3* bzw. *exo70* in einem Wildtyp Hintergrund deletiert, führt dies interessanterweise nur bei $\Delta sec3$ Zellen zu sehr starken morphologischen Defekten (Abb. 2.18 B). $\Delta exo70$ Mutanten weisen dagegen keine Veränderungen des Phänotyps im Vergleich zu Bub8 auf. Desweiteren konnte mittels Calcofluor, einem chitinspezifischen Fluoreszenzfarbstoff, gezeigt werden, dass *exo70* Deletionsmutanten wie der Wildtyp zwei Septen bilden, wohingegen sich $\Delta sec3$ Zellen durch ein zentrales Septum trennen, ähnlich einer $\Delta rac1$ Mutante.

Basierend auf den Beobachtungen, dass Exo70 an Stellen aktiver Exozytose lokalisiert und eine Deletion von *exo70* keinen Einfluss auf das knospende Wachstum hat, sollte im Folgenden eine nähere Untersuchung der Funktion von Exo70 im Vergleich zu Sec3 durchgeführt werden. Um zu überprüfen, ob Exo70 in das filamentöse Wachstum involviert ist, wurde mittels homologer Rekombination eine Deletionsmutante von *exo70* im AB31 Hintergrund hergestellt. Von AB31 $\Delta sec3$ ist bekannt, dass die Zellen noch in der Lage sind, Filamentansätze zu bilden. Die Filamente sind im Vergleich zu deren Ausgangsstamm AB31

2. Ergebnisse

jedoch viel dicker und sehr kurz (Abb. 2.18 C, (Wehr, 2008)). Abbildung 2.18. C zeigt, dass die Deletion von *exo70* im Gegensatz zu $\Delta sec3$ keine Auswirkungen auf die Filamentbildung hat.

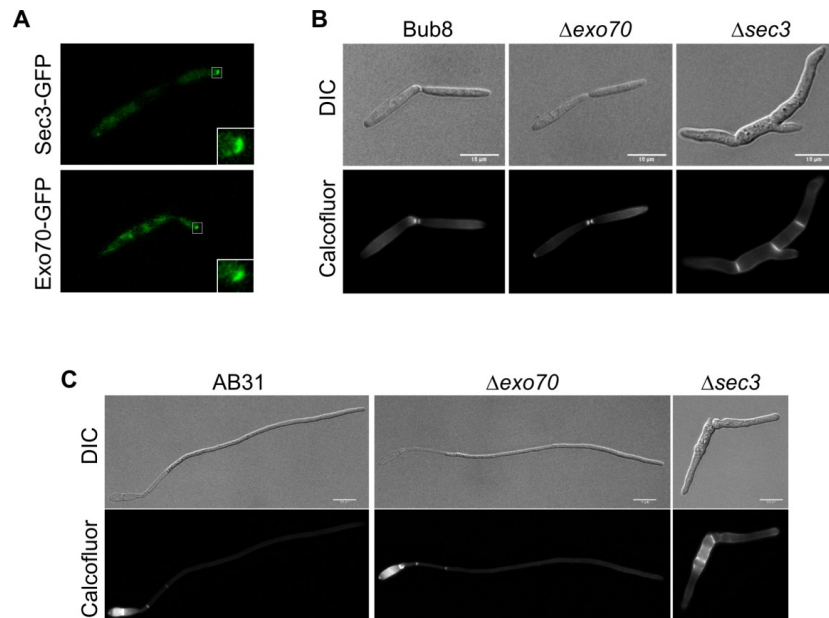


Abbildung 2.18: Deletionsmutanten von *exo70* zeigen keine morphologischen Veränderungen während des knospenden und filamentösen Wachstums. (A) In Zusammenarbeit mit Kay Oliver Schink wurden C-terminale GFP-Fusionen von *sec3* und *exo70* mittels homologer Rekombination am genomischen Lokus generiert. Aufgrund des schwachen Signals wurden die Bilder mit Hilfe der ImageJ Software dekonvolviert. Beide Proteine lokalisieren an der Spitze. (B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Phänotyps einer $\Delta exo70$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Bub8) und $\Delta sec3$ Mutante (in Bub8 Hintergrund) während des knospenden Wachstums in YEPS Medium bei 28 °C. Im Gegensatz zur $\Delta sec3$ Mutante zeigt eine $\Delta exo70$ Mutante keinen morphologischen Defekt. Auch die Septenbildung, welche mit Calcofluor markiert wurde, ist normal. (C) Um zu untersuchen, ob Exo70 während des filamentösen Wachstums benötigt wird, wurde eine *exo70* Deletion in AB31 hergestellt. Als Kontrollen dienten der Wildtyp AB31 und die entsprechende $\Delta sec3$ Mutante. Die Stämme wurden für 14 h in YEP Medium (2 % Arabinose) inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die $\Delta exo70$ Mutante zeigt keine Defekte in der Morphologie bzw. Septenbildung, wie es bei $\Delta sec3$ Mutanten der Fall ist.

Da Exo70 keine essentielle Rolle während des knospenden und filamentösen Wachstums spielt, sollte als nächstes untersucht werden, ob die Deletion von *exo70* einen Effekt auf die Paarungskompetenz von *U. maydis* hat. Dabei könnte Exo70 an der Ausbildung der Konjugationshyphen beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein Kreuzungstest mit den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 und Bub8 sowie ihren jeweiligen $\Delta exo70$ Mutanten durchgeführt. Im Gegensatz zu *sec3* Deletionsmutanten zeigen die Kreuzungen von $\Delta exo70$ Mutanten ein normales Kreuzungsverhalten wie bei FB1 und Bub8 (Abb. 2.19 A). Dies deutet auf eine von Exo70 unabhängige Paarungskompetenz hin.

2. Ergebnisse

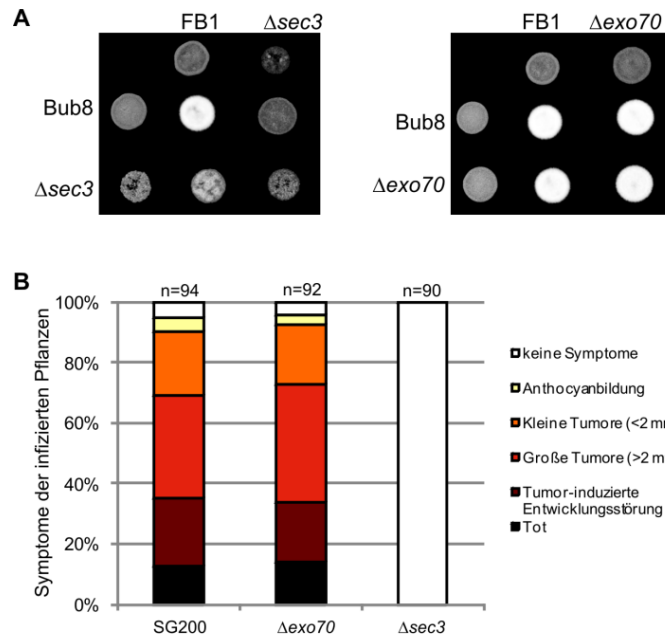


Abbildung 2.19: Die Deletion von *exo70* hat keinen Effekt auf das Kreuzungsverhalten und die pathogene Entwicklung. (A) Kreuzungstest von Bub8- und FB1-Wildtyp und jeweiliger Mutanten. Die Stämme wurden alleine oder als kompatible Mischung (1:1) auf aktivkohlehaltige PD-Platten getropft und zwei Tage bei 20 °C inkubiert. Kompatible Stämme bilden nach erfolgreicher Zellfusion ein dikaryotisches Filament, welches auf aktivkohlehaltigen Platten als weiße Kolonie sichtbar ist. Die Deletion von *exo70* (rechts) zeigt im Vergleich zu $\Delta sec3$ (links) keinen Defekt im Kreuzungsverhalten. (B) Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit SG200 AM-mCherry und dessen Derivaten injiziert und nach 11 Tagen erfolgte die Auswertung der Symptome der einzelnen Pflanzen in 6 Kategorien (Legende). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die prozentualen Anteile zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt. Die Deletion von *exo70* zeigt auch hier keinen Defekt im Vergleich zum Wildtyp, $\Delta sec3$ hingegen ist apathogen.

Ein weiterer Prozess, bei dem die Exozytose eine wichtige Rolle spielt, ist die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Mit Hilfe von Exozytose können Enzyme und Pilztoxine während der Pflanzeninfektion nach außen abgegeben werden. Daher könnte es sein, dass Exo70 in diesen Prozess involviert ist. Um dies zu überprüfen, wurde eine *exo70* Deletion im Stamm SG200AM-mCherry generiert und anschließend sieben Tage alte Maispflanzen infiziert. Nach 11 Tagen fand die Auswertung der Symptome in 6 Kategorien statt. Als Kontrollen dienten SG200AM-mCherry und SG200AM-mCherry $\Delta sec3$. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Infektion einer Kreuzung von kompatiblen $\Delta sec3$ Stämmen in einer Apathogenität resultiert (Wehr, 2008). Dies konnte auch bei SG200AM-mCherry $\Delta sec3$ beobachtet werden (Abb. 2.19 B). SG200 AM-mCherry $\Delta exo70$ allerdings zeigt eine ähnliche Tumorbildung wie der Kontrollstamm SG200 AM-mCherry (Abb. 2.20 B). Dies deutet darauf hin, dass Exo70 kein essentieller Virulenzfaktor ist.

2. Ergebnisse

#Basierend auf den Ergebnissen, dass die Deletion von *exo70* keine Defekte während des Wachstums, des Kreuzungsverhalten und der pathogenen Entwicklung aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass Exo70 entweder kein Landmarkprotein für die Exozytose ist oder eine redundante Funktion zu Sec3 besitzt. Dies sollte mit Hilfe einer *sec3* und *exo70* Doppeldeletionsmutante überprüft werden. Nach mehreren Wiederholungen gelang es jedoch nicht, eine solche Mutante zu generieren, was ein Hinweis auf eine synthetische Letalität sein könnte.

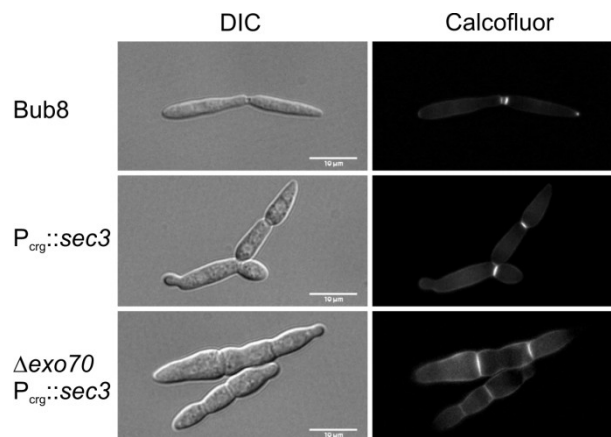


Abbildung 2.20: Eine Reprimierung von *sec3* in einer *exo70* Deletionsmutante führt zu einem starken morphologischen Defekt. Die angegebenen Stämme wurden für 6 h bei 28 °C in YEP Medium (2 % Glukose) inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass Zellen mit einer Depletion von *sec3* in einem *Δexo70* Hintergrund dicker sind und somit einen viel stärkeren morphologischen Defekt zeigen als die Repression von Sec3 im Wildtyp Hintergrund. Zudem weisen beide Stämme einen Zelltrennungsdefekt auf und bilden im Vergleich zum Wildtyp nur ein Septum.

Daher wurde in einem neuen Ansatz der native Promotor von *sec3* durch den *crg* Promotor im *Δexo70* Hintergrund ersetzt. Eine Repression von Sec3 zusammen mit einer Deletion von *exo70* führt zu deutlich dickeren Zellen als die Reprimierung von *sec3* in Wildtypzellen (Abb. 2.20). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Exo70 eine zu Sec3 teilweise redundante Funktion besitzt.

2.5.2 Sec3 interagiert mit der GDP-gebundenen Form der GTPase

Aufgrund der wahrscheinlich teilweise redundanten Funktion von Exo70 als Landmarkprotein wurde im Folgenden allein mit Sec3 weitergearbeitet und dabei die Beziehung zu den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 näher untersucht. In früheren Studien konnte bereits eine Interaktion von *U. maydis* Sec3 mit Cdc42 und Rac1 gezeigt werden (Schink, 2010). Die Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Interaktion unabhängig vom

2. Ergebnisse

Beladungszustand der GTPase ist. Da die Analysen durch Zwangsbeladung der GTPasen erfolgte, sollte dies nun mit Hilfe von dominant negativen und konstitutiv aktiven Varianten dieser GTPasen überprüft bzw. bestätigt werden. Der Austausch von Threonin zu Asparagin an Position 17 führt zur Inhibierung des Austausches von GDP zu GTP und somit zu einer dominant negativen Form der GTPase (Feig & Cooper, 1988). Dagegen resultiert der Austausch von Glutamin zu Leucin an Position 61 in einem Defekt der intrinsischen GTPase Aktivität (Ziman et al, 1991). *In vitro* konnte mittels GST-Kopräzipitation die Interaktion von Sec3-3HA mit Rac1^{T17N}, Cdc42^{T17N}, Rac1^{Q61L}, Cdc42^{Q61L}, Rac1, Cdc42 und GST untersucht werden. Dafür wurden die GST fusionierten GTPasen an Glutathion Sepharose Beads gebunden und mit Proteinextrakt aus *U. maydis* Stämmen, die entweder Cla4-GFP oder ein Sec3-3HA Fusionsprotein exprimieren, inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Beladung von Rac1^{T17N} und Cdc42^{T17N} mit GDP bzw. von Rac1^{Q61L} und Cdc42^{Q61L} mit nicht hydrolysierbarem GTPγS. Cla4, von dem bekannt ist, dass es als Rac1 Effektor während des polaren Wachstums wirkt und bevorzugt mit aktiven Rac1 interagiert, diente als Kontrolle (Frieser et al, 2011).

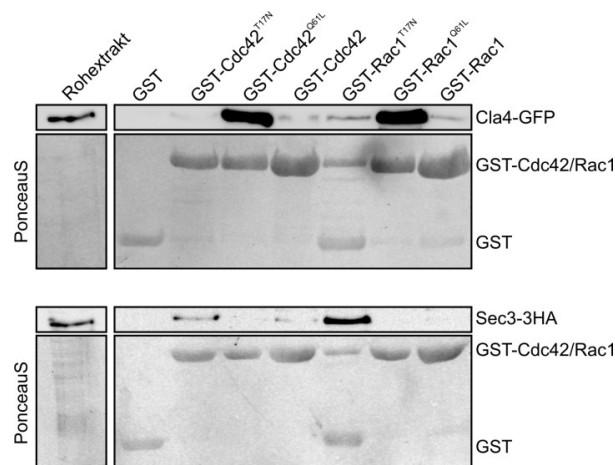


Abbildung 2.21: Sec3 zeigt die stärksten Interaktionen mit den GDP-beladenen Formen von Rac1 und Cdc42. Für *in vitro* Interaktions Assays mittels GST-Kopräzipitation wurden die verschiedenen Derivate der GST fusionierten Proteine von Rac1 und Cdc42 an Glutathion Sepharose Beads gebunden und mit einem Proteinextrakt aus *U. maydis* (*etef* Promotor reguliertes Cla4-GFP bzw. C-terminale 3HA Fusion am genomischen *sec3* Locus) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Visualisierung der Kopräzipitation mittels SDS-PAGE. Die anschließende Western-Analyse wurde mit anti-GFP und anti-HA Antikörpern durchgeführt. Bei Cdc42^{T17N} und Rac1^{T17N} handelt es sich um dominant negative Formen der GTPase, die zusätzlich mit GDP beladen wurden. Cdc42^{Q61L} und Rac1^{Q61L} hingegen sind konstitutiv aktive Formen, und wurden zusätzlich mit nicht hydrolysierbarem GTPγS beladen. Im oberen Bild dient das mit der aktiven Form von Rac1 und Cdc42 interagierende Cla4-GFP als Kontrolle, während im unteren Bild die Interaktion von Sec3 mit den GTPasen dargestellt ist. Die Analyse zeigt eine deutliche Interaktion von Sec3 mit den inaktiven Formen der GTPasen. Zudem zeigt die PonceauS-Färbung, dass die GST-Rac1^{T17N} Probe sehr instabil ist und viel GST enthält als GST-Rac1^{T17N}.

2. Ergebnisse

In Abbildung 2.21 ist dargestellt, dass Cla4-GFP wie erwartet am stärksten mit den dominant aktiven GTPasen interagiert und nur schwach mit Cdc42^{T17N}, Cdc42, Rac1^{T17N} und Rac1. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Sec3-3HA am stärksten mit Rac1^{T17N} interagiert. Zudem zeigt Sec3-3HA eine Interaktion mit Cdc42^{T17N} und eine etwas schwächere mit Cdc42. Hinzukommt, dass die Ladekontrolle (PonceauS-Färbung) zeigt, dass GST-Rac1^{T17N} im Vergleich zu den anderen GST fusionierten GTPasen nur eine schwache Bande zeigt. Dies könnte darauf hindeuten, dass GST-Rac1^{T17N} instabil ist. Jedoch bekräftigt es, dass Sec3 am stärksten mit der GDP-gebundenen Form von Rac1 interagiert.

2.5.3 Untersuchung der Lokalisation von Sec3 in unterschiedlichen *rac1* Mutanten

Basierend auf den Ergebnissen der Interaktionsstudien von Sec3 mit den GTPasen und der Tatsache, dass Sec3p in Hefe durch Rho-GTPasen reguliert wird (Guo et al, 2001; Zhang et al, 2001), wurde als nächstes die Lokalisation von Sec3 in Abhängigkeit von GTPasen untersucht.

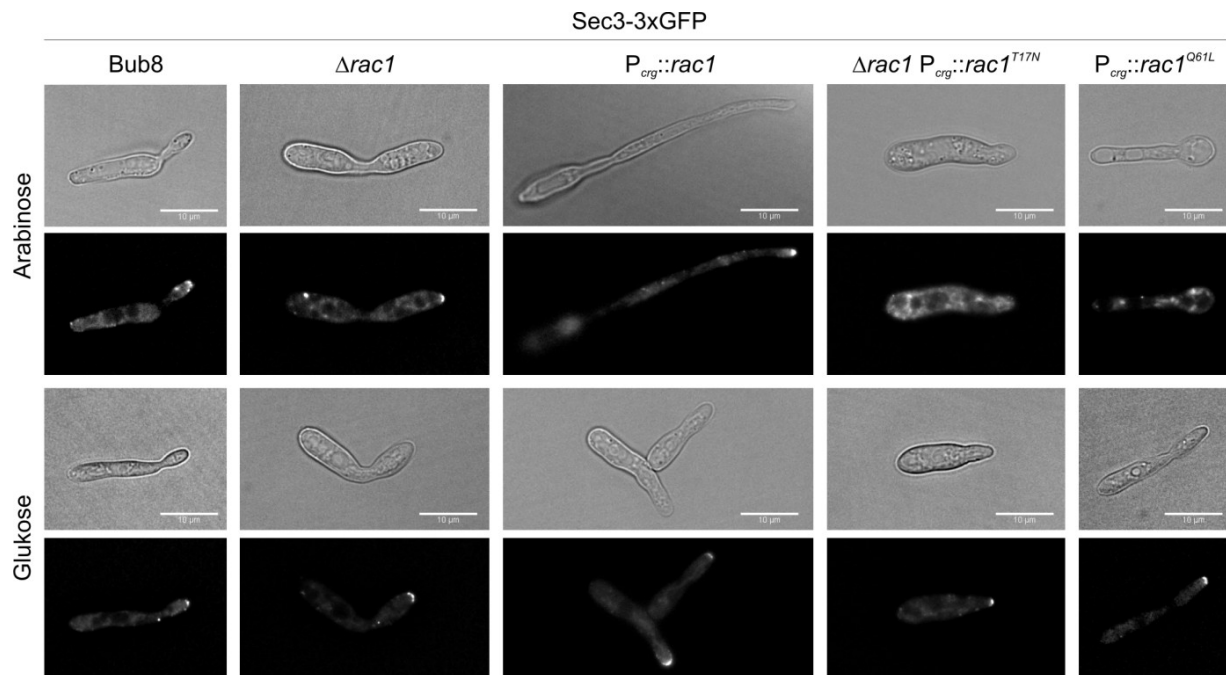


Abbildung 2.22: Lokalisation von Sec3-3xGFP in verschiedenen *rac1* Mutanten. Eine C-terminale 3xGFP-Fusion von *sec3* am genomischen Lokus wurde generiert und die genannten Stämme für 6 h bei 28 °C in YEP Medium (2 % Arabinose bzw. 2 % Glukose) inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Lokalisation untersucht. Aufgrund des schwachen Signals wurden die Bilder mit der ImageJ Software dekonvolviert. Sec3-3GFP lokalisiert im Wildtyp (Bub8) an der wachsenden Spitze und teilweise als Akkumulation in der Zelle (sowohl mit Arabinose als auch Glukose). Dieselbe Lokalisation konnte auch in $\Delta rac1$ Zellen und bei einer Überexpression bzw. Repression von Rac1 beobachtet werden. Werden dominant negatives Rac1 (Rac1^{T17N}) oder dominant aktives Rac1 (Rac1^{Q61L}) über exprimiert, führt dies zur Delokalisation von Sec3-3xGFP.

2. Ergebnisse

Hierbei sollte besonders der Einfluss von Rac1 analysiert werden, da zum einen die Interaktion mit Rac1^{T17N} und Sec3 am stärksten war und zum anderen weil $\Delta rac1$ einen ähnlichen Phänotyp aufweist wie $\Delta sec3$ Zellen. Aufgrund der schwachen Expression von Sec3 wurde eine C-terminale 3xGFP-Fusion von *sec3* durch homologe Rekombination am genomischen Locus in verschiedenen Stammhintergründen generiert. Wie bereits erwähnt, lokalisiert Sec3 an der wachsenden Spitze und es kommt teilweise zu Akkumulationen innerhalb der Zelle (Abb. 2.18 A und Abb. 2.22). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch nach 6 Stunden Inkubation in YEP-Medium mit 2 % Arabinose bzw. 2 % Glukose bei $\Delta rac1$ Zellen und bei einer Überexpression bzw. Reprimierung von Rac1 gezeigt werden (Abb. 2.22). Wird jedoch Rac1^{T17N} überexprimiert, führt dies zu einer Delokalisation von Sec3. Dies konnte auch bei einer Überexpression von Rac1^{Q61L} beobachtet werden. Da Sec3 in Abwesenheit von Rac1 eine Spitzenlokalisation aufweist, kann vermutet werden, dass Rac1 für die Lokalisation von Sec3 nicht notwendig ist. Dennoch zeigt die Delokalisation von Sec3 bei einer Überexpression von Rac1^{T17N} sowie die starke Interaktion mit der GDP-gebundenen GTPase, dass Rac1 wohlmöglich durch Sec3 reguliert wird.

3. Diskussion

Der dimorphe Pilz *U. maydis* durchläuft während seines Lebenszyklus eine nicht-pathogene, haploide und eine pathogene, dikaryotische Form. Treffen zwei, in ihren Kreuzungstyploci kompatible, haploide Sporidien aufeinander, kommt es zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang eines Pheromongradienten aufeinander zuwachsen (Bölker et al, 1992; Snetselaar et al, 1996; Spellig et al, 1994a). Die anschließende Fusion und Ausbildung des dikaryotischen Filaments leitet die pathogene Entwicklung ein. Die Verarbeitung des Pheromonsignals und die daraus resultierende pathogene Entwicklung wird durch ein Zusammenspiel des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Signalkaskade reguliert (Brefort et al, 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gds1 sowohl am filamentösen Wachstum (Abschnitt 3.3) als auch an der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* beteiligt ist.

3.1 Gds1 ist ein spezifischer GEF für Rho-GTPasen und besitzt vermutlich einen neuartigen Wirkungsmechanismus

Kleine GTPasen der Rho- und Ras-Familie spielen bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle, wie z.B. bei der Regulation der Genexpression und der Reorganisation des Zytoskeletts (Takai et al, 2001). Dabei fungieren sie als molekulare Schalter und können zwischen der inaktiven GDP-gebundenen Form und der aktiven GTP gebundenen-Form wechseln. Der Austausch von GDP zu GTP kann spontan oder durch GTPase spezifische GEFs katalysiert werden (Bourne et al, 1990). Während Ras-spezifische GEFs meist eine CDC25- Domäne (RasGEF-Domäne) besitzen, werden Rho-GTPasen in der Regel durch GEFs der Dbl- bzw. Dock180-Familie aktiviert, die eine DH (Dbl-Homologie) bzw. DHR2 (DOCK Homologie Region 2) als katalytische Domäne aufweisen (Boguski & McCormick, 1993; Broek et al, 1987; Cote & Vuori, 2002; Hart et al, 1994). Außer diesen typischen GEFs gibt es noch einen weiteren GEF, SmgGDS, der überwiegend aus Armadillo-Wiederholungen besteht und sowohl Ras- als auch Rho-GTPasen aktivieren kann (Isomura et al, 1990; Peifer et al, 1994; Yamamoto et al, 1990). Dieser, in zwei Isoformen existierende,

3. Diskussion

GEF wurde erstmals aus Rinderhirnzellen isoliert und als Aktivator von Rap1A, Rap1B, K-ras, Rac1, Rac2, Cdc42, RhoA und RhoB beschrieben (Chuang et al, 1994; Hiraoka et al, 1992; Isomura et al, 1990; Mizuno et al, 1991; Yaku et al, 1994; Yamamoto et al, 1990). Einige dieser Studien weisen jedoch widersprüchliche Ergebnisse auf. So konnten Yamamoto et al. zeigen, dass SmgGDS Rap1b aber nicht RhoB aktiviert, während Isomura et al. das Gegenteil zeigt und von einer Aktivierung von RhoB durch SmgGDS berichten (Hutchinson et al, 2000; Yamamoto et al, 1990). Da SmgGDS mit anderen GEFs interagieren kann (Shin et al, 2006), könnte eine mögliche Ursache für die Kontroversen in der Aufreinigung von SmgGDS liegen, das aus Hirnzellenextrakten gewonnen wurde. Demnach kann eine Kontamination mit anderen GEFs eventuell nicht ausgeschlossen werden. Eine neuere Studie mit humanem SmgGDS, in der sowohl der GEF als auch die GTPasen aus *E. coli* Zellen aufgereinigt wurden, konnte *in vitro* zeigen, dass SmgGDS den Nukleotid-Austausch von den Rho-GTPasen RhoA und RhoC katalysieren kann, nicht aber den von RhoB, Cdc42, Rac1, Rac2 und Ras-GTPasen (Hamel et al, 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch Interaktionsstudien (Hefe-Zwei-Hybrid, GST-Kopräzipitation) gezeigt werden, dass das SmgGDS Homolog Gds1 aus *U. maydis* mit den Rho-GTPasen (Cdc42, Rac1, Rho1, Rho2, Rho3 und Rho4) und den Ras-GTPasen (Ras1 und Ras2) *in vitro* nicht aber *in vivo* interagieren kann. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich um eine indirekte Interaktion handelt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Gds1 direkt mit den GTPasen interagiert, dafür aber das für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse deletierte CAAX-Motiv der GTPasen benötigt, wie es bei der humanen Isoform SmgGDS-607 gezeigt werden konnte (Schuld et al, 2014b). Das CAAX-Motiv fungiert als Signal für eine posttranslationale Modifizierung, was der GTPase die Rekrutierung und Verankerung in der Membran ermöglicht (Adamson et al, 1992a). Kleine GTPasen können entweder farnesyliert oder geranyl-geranyliert werden. Dies hängt besonders von der letzten Aminosäure des CAAX-Motives ab (Casey et al, 1991; Hartman et al, 2005; Yokoyama et al, 1991). Vom humanen SmgGDS konnte gezeigt werden, dass es bevorzugt an das CAAX-Motiv von GTPasen bindet, die geranyliert-geranyliert werden und somit ein Leucin besitzen (Schuld et al, 2014b). In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine schwache Interaktion von Gds1 mit Rho3 beobachtet werden. Ein Vergleich der CAAX-Motive der einzelnen GTPasen zeigt, dass außer Rho3 alle getesteten GTPasen mit einem Leucin enden, während Rho3 hingegen ein Alanin an vierter Position besitzt (Abb. 3.1). Dies könnte eine Erklärung für die im Vergleich zu den anderen GTPasen schwache Interaktion von Gds1 mit Rho3 sein.

3. Diskussion

Gleichzeitig bekräftigt es die Hypothese, dass Gds1 für eine Interaktion mit den GTPasen das CAAX-Motiv bzw. die dadurch ausgelöste posttranslationale Modifikation benötigt.

GTPasen	CAAX-Motiv
Cdc42	C A I L
Rac1	C M I L
Rho1	C V L L
Rho2	C I V L
Rho3	C T I A
Rho4	C T V L
Ras1	C I V L
Ras2	C N I L

Abbildung 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der CAAX-Motive von Rho- und Ras-GTPasen aus *U. maydis*. Das CAAX-Motiv besteht aus einem Cystein an erster Position, welches von zwei aliphatischen Aminosäuren und einer beliebigen Aminosäure gefolgt wird. Der Vergleich der CAAX-Motive zeigt, dass alle Rho- und Ras-GTPasen mit einem Leucin enden mit Ausnahme von Rho3, welches an vierter Position ein Alanin besitzt.

Aufgrund der Interaktionen von Gds1 mit den GTPasen liegt die Vermutung nahe, dass Gds1 in *U. maydis* ebenfalls als ein GEF für Rho-GTPasen und/oder Ras-GTPasen wirkt. *In vitro* GEF-Assays konnten zeigen, dass Gds1 die beiden RhoA und RhoC homologen Proteine, Rho1 und Rho4, schwach aktivieren kann. Basierend auf der Aktivierung von Rho1 und Rho4 durch Gds1, kann davon ausgegangen werden, dass eine direkte Interaktion *in vitro* stattgefunden hat, was wiederum im Einklang mit der Hypothese ist, dass das CAAX-Motiv für die Interaktion benötigt wird. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass in GEF-Assays von Gds1 mit Rho1 bzw. Rho4 ohne CAAX-Motiv, Gds1 nicht in der Lage war, den Nukleotid-Austausch zu katalysieren (Daten nicht gezeigt). Über die Funktion von Rho1 und Rho4 in *U. maydis* ist bis jetzt kaum etwas bekannt, ebenso wie über die Funktion von Rho2 und Rho3. Frühere Studien konnten zeigen, dass es sich bei *rho1* um ein essentielles Gen handelt und Rho1 an dem Kreuzungsverhalten, der Vakuolenbildung, und dem filamentösen Wachstum beteiligt ist (Pham & Perlin, 2010; Pham et al, 2009). Von Rho3 dagegen wurde bis jetzt nur der mRNA-Transport näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mRNA von *rho3* eine Ziel-mRNA des RNA bindenden Proteins Rrm4 ist, das an Endosomen sitzt und Mikrotubuli-abhängig transportiert wird (König et al, 2009). Im Gegenteil zu Rho1 und Rho4 konnten Rho2 und Rho3 nicht von Gds1 aktiviert werden. Auffällig war allerdings, dass bei einem GEF-Assay mit Rho3 nach Zugabe von EDTA ein starker Abfall der Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Da EDTA als Chelator wirkt und Rho3 das für die Nukleotid-Bindung benötigte Mg^{2+} entzieht, könnte dies ein Hinweis sein, dass Rho3 ohne Mg^{2+} sehr

3. Diskussion

instabil ist. Im Gegensatz zum humanen SmgGDS konnte jedoch eine starke Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 durch Gds1 gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass Gds1 in *U. maydis* ein für Rac1-spezifischer GEF ist. Somit konnte, neben dem bereits bekannten GEF Cdc24, ein weiterer Rac1-spezifischer GEF in *U. maydis* identifiziert werden. Rac1 spielt in *U. maydis* während des polaren Wachstums eine essentielle Rolle. Eine Deletion von *rac1* führt zu einem starken morphologischen Defekt und die Zellen sind nicht mehr in der Lage, filamentös zu wachsen (Mahlert et al, 2006). Da Gds1 mit Rac1 sowohl interagieren als auch es aktivieren kann, könnte dies darauf hinweisen, dass die Funktion von Gds1 während des filamentösen Wachstums die Aktivierung von Rac1 ist (Abschnitt 3.2). Die kleine GTPase Cdc42, die eine wichtige Rolle während der Zytokinese spielt und eine sehr hohe Sequenzidentität zu Rac1 aufweist (Mahlert et al, 2006), konnte durch Gds1 dagegen nicht aktiviert werden. Aufgrund der geringen Aktivität der Ras-GTPasen in den GEF-Assays, kann nicht sicher entschieden werden, ob Gds1 eine schwache spezifische Aktivität für den Nukleotid-Austausch von Ras1 zeigt, nicht aber für den von Ras2. Um diese Hypothese zu analysieren, müssten noch weitere Untersuchungen erfolgen. So könnte z.B. getestet werden, ob Gds1 Ras1 *in vivo* aktivieren kann. Dies könnte über eine Analyse der Cdc24 Stabilität überprüft werden, da bekannt ist, dass aktives Ras1 zu einem Abbau von Cdc24 führt (Bauer, 2011). Eine andere Möglichkeit wäre, einen *pull down* mit der Ras-Interaktions-Domäne und *U. maydis* Proteinextrakt, aus Kulturen mit und ohne Überexpression von Gds1, durchzuführen.

Rac1 und Cdc42 besitzen zwar eine sehr hohe Sequenzidentität, jedoch kann Gds1 nur bei Rac1 den Nukleotid-Austausch katalysieren. Daher stellte sich die Frage, wie Gds1 zwischen Rac1 und Cdc42 unterscheidet. Von den Rho-GEFs der Dbl-Familie ist beschrieben, dass die Aminosäure an Position 56 der GTPase für die Spezifitätsbestimmung wichtig ist (Gao et al, 2001; Karnoub et al, 2001). So besitzt Cdc42 an Position 56 immer ein Phenylalanin während es in Rac1 ein Tryptophan ist. In *U. maydis* spielt diese Aminosäure ebenfalls eine wichtige Rolle, so kann der Cdc42-spezifische GEF Don1 die veränderte GTPase Cdc42^{F56W} nicht mehr aktivieren, dafür aber Rac1^{W56F} (Hlubek et al, 2008). Die Aminosäure an Position 56 ist jedoch nicht für alle GEFs der Dbl-Familie wichtig, so konnte bereits in *U. maydis* für den Cdc42-spezifischen GEF Hot1 gezeigt werden, dass er über eine andere Spezifitätsbestimmung verfügt. Dabei sind die ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 wichtig (Tillmann, 2013). Da Gds1 im Gegensatz zu den GEFs der Dbl-Familie keine katalytische DH-Domäne besitzt, sondern Armadillo-Wiederholungen, war es sehr unwahrscheinlich,

3. Diskussion

dass die Aminosäure an Position 56 kritisch für die Aktivierung durch Gds1 ist. Diese Vermutung konnte in GEF-Assays bestätigt werden. Untersuchungen in Säugern zeigten, dass die polybasische Region der GTPase für eine erfolgreiche Interaktion und Aktivierung durch SmgGDS wichtig ist (Lanning et al, 2003; Vikis et al, 2002; Williams, 2003). Wird diese deletiert, konnte keine Aktivierung von RhoA durch SmgGDS beobachtet werden (Hamel et al, 2011). Dabei ist die genaue Aminosäuresequenz nicht von primärer Bedeutung, solange es sich um eine stark polybasische Region handelt. Da allerdings auch die chimäre GTPase Rac1pbr_(RhoA) nicht durch SmgGDS aktiviert werden konnte, muß angenommen werden, dass neben der polybasischen Region ein weiterer Bereich von RhoA für die Aktivierung durch SmgGDS wichtig ist (Hamel et al, 2011). Dadurch, dass in *U. maydis* das CAAX-Motiv für die generelle Interaktion von Gds1 mit GTPasen wichtig ist, liegt die Vermutung nahe, dass Rac1 zusätzlich eine weitere Region besitzt, die für die spezifische Erkennung durch Gds1 wichtig ist. Um diese Region einzugrenzen, wurden GEF-Assays mit Gds1 und verschiedenen chimären GTPasen, bestehend aus Rac1 und Cdc42, durchgeführt. Während die chimäre GTPase R118C, die aus den 118 N-terminalen Aminosäuren von Rac1 und den C-terminalen Aminosäuren von Cdc42 besteht, nicht von Gds1 aktiviert werden konnte, erfolgte eine Aktivierung von R157C durch Gds1. Basierend auf diesem Ergebnis, kann postuliert werden, dass die Region zwischen den Aminosäuren 118 und 157 von Rac1 für die spezifische Erkennung durch Gds1 wichtig ist. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die im Vergleich zu Cdc42 sehr unterschiedliche Aminosäuresequenz zwischen 118 bis 157. Wenn dies die einzige spezifitätsbestimmende Region für Gds1 ist, müsste Gds1 auch die korrespondierende GTPase C118R aktivieren können. Dies war jedoch nicht der Fall, was darauf hindeutet, dass neben der Region zwischen Aminosäure 118 und Aminosäure 157 noch eine weitere Domäne im N-terminalen Bereich vor Aminosäure 118 liegt, die für die spezifische Aktivierung durch Gds1 wichtig ist.

SmgGDS besitzt im Zentrum eine hochkonservierte negativgeladene Region und am C-Terminus eine durch die ARM generierte helikale Bindungsfurche. In Hamel et al. wird daher angenommen, dass sich die GTPase in die helikale Bindungsfurche von SmgGDS legt und die polybasische Region der GTPase mit der negativgeladenen Region von SmgGDS eine elektrostatische Interaktion eingeht. Werden hochkonservierte Aminosäuren in diesen zwei Regionen mutiert, führt dies zu einer abgeschwächten Aktivierung von RhoA durch SmgGDS bzw. zum vollständigen Verlust der Aktivierung (Hamel et al, 2011). Gds1 von *U. maydis* besitzt ebenfalls diese hochkonservierten Aminosäuren in der Bindungsfurche. In der

3. Diskussion

vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gds1^{N600A R603A} nicht mehr in der Lage war, den Nukleotid-Austausch von Rac1 zu katalysieren. Zirkulardichroismus-Spektroskopien bestätigten, dass die sekundäre Struktur von humanen SmgGDS^{N343A R346A} nicht durch diese Mutationen beeinflusst wird (Hamel et al, 2011), daher kann vermutet werden, dass auch Gds1^{N600A R603A} keine veränderte Sekundärstruktur besitzt. Zudem zeigten Interaktionsstudien, dass in *U. maydis* Gds1^{N600A R603A} noch mit Rac1 interagieren kann. Aufgrund dieser Interaktionen, kann ausgeschlossen werden, dass diese Aminosäuren für die Bindung mit der GTPase wichtig sind, wie es in Hamel et al. postuliert wurde. Es deutet eher darauf hin, dass das Asparagin an Position 600 und das Arginin an Position 603 wahrscheinlich für die katalytische Funktion von Gds1 benötigt werden.

3.2 Gds1 spielt eine wichtige Rolle während des filamentösen Wachstums und benötigt dafür die GEF-Aktivität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* eine Deletion von *gds1* zu einer verzögerten Filamentbildung sowohl beim *b*-abhängigen als auch beim Rac1-induzierten Filament führt. Das *b*-Filament entsteht nach erfolgreicher Fusion zweier kompatibler haploider Sporidien, wobei die MAPK-Kaskade durch ein autokrines Pheromonsignal aktiviert wird. Dies führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Prf1 (Kaffarnik et al, 2003; Müller et al, 2003b; Zarnack et al, 2008). Prf1 induziert daraufhin die Expression der *b*-Gene, was wiederum in einer verstärkten Bildung von kompatiblen bE/bW Heterodimeren resultiert, die selbst ebenfalls als Transkriptionsfaktoren wirken und das filamentöse Wachstum einleiten (Brachmann et al, 2001; Kaffarnik et al, 2003; Kämper et al, 1995). Das *b*-abhängige Filament kann auch durch die Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers erzeugt werden (Brachmann et al, 2001). Rac1-induzierte Filamente hingegen entstehen durch die Überexpression der kleinen GTPase Rac1 und unterscheiden sich von den natürlich vorkommenden Filamenten (Mahlert et al, 2006). Obwohl beide Filamente abhängig von Rac1 sind, weisen sie deutliche Unterschiede zueinander auf, wie zum Beispiel in der Anzahl der Filamente pro Zelle oder im Fehlen oder Vorhandensein eines Zellzyklusarrestes (Mahlert et al, 2006). Zudem benötigt das *b*-Filament bei einer Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers keine MAPK-Kaskade, während das Rac1-induzierte Filament von dieser abhängig ist (Bauer, 2011; Müller et al, 2003b). Aufgrund der Interaktion von Ras1 mit Kpp4, das wiederum mit Ubc2 interagiert und Ubc2 mit Rac1, wurde postuliert, dass die MAPK-Kaskade für das Zusammenbringen von Ras1

3. Diskussion

mit Rac1 benötigt wird und Ras1 dadurch den Rac1-Signalweg aktivieren kann (Bauer, 2011; Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 2001). Basierend auf der Hypothese, dass Gds1 als Gerüstprotein agiert (Abschnitt 3.3, Abb. 3.2) und mit allen vier Komponenten (Ras1, Rac1, Kpp4 und Ubc2) interagieren kann, könnte es sein, dass Gds1 die Interaktion dieser Komponenten stabilisiert und dadurch eine effizientere Kommunikation von Ras1, Rac1, Kpp4 und Ubc2 bewirkt. Dies würde erklären, dass eine Deletion von *gds1* zu einer verzögerten Filamentbildung führt, da der Komplex aus den beschriebenen Komponenten instabiler ist und die Bildung mehr Zeit benötigt. Auch beim *b*-abhängigen Filament könnte Gds1 als Gerüstprotein oberhalb der MAPK-Kaskade wirken. Da jedoch die Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers die verzögerte Filamentbildung einer $\Delta gds1$ Mutante nicht supprimieren kann, deutet es eher darauf hin, dass Gds1 ebenso wie Rac1 unterhalb von *b* agiert. Basierend auf der direkten Interaktion von Gds1 mit Rac1 und der Tatsache, dass Gds1 ein Rac1-spezifischer GEF ist, liegt die Vermutung nahe, dass Gds1 während des *b*-abhängigen Filaments am Rac1-Signalweg beteiligt ist. Rac1 ist eine essentielle Komponente für das polare Wachstum (Mahlert et al, 2006) und wird dabei an der Spitze durch den Rac1-spezifischen GEF Cdc24 aktiviert. Dieser wiederum befindet sich in einem Komplex mit dem Gerüstprotein Bem1 und der PAK (p21 aktivierten Kinase) Cla4 befindet (Frieser et al, 2011). Die daraus resultierende Konformationsänderung ermöglicht es Rac1, den Effektor Cla4 zu aktivieren. Im weiteren Verlauf phosphoryliert Cla4 unter anderem Cdc24 und andere bisher unbekannte Proteine, die die Morphogenese und Polarität steuern (Frieser et al, 2011). In *S. cerevisiae* konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Cla4p zusammen mit Ste20p die beiden Typ I Myosine, Myo3p und Myo5p phosphoryliert. Diese Proteine sind als Aktivatoren des Aktin polymerisierenden Arp2/3 (*actin related protein 2/3*) Komplex bekannt. Dadurch haben Cla4p und Ste20p regulatorischen Einfluss auf das Aktinzytoskelett (Lechler et al, 2001; Wu et al, 1996a; Wu et al, 1997a). In *U. maydis* ist der Komplex bestehend aus Bem1, Cdc24, Rac1 und Cla4 essentiell für die Polarität sowohl während des hefeartigen also auch während des filamentösen Wachstums. Deletionen der einzelnen Komponenten sind letal oder führen zu starken morphologischen Defekten und die Zellen sind nicht mehr in der Lage, filamentös zu wachsen (Frieser et al, 2011; Leveleki et al, 2004; Mahlert et al, 2006). Da $\Delta gds1$ Mutanten nur ein verzögertes filamentöses Wachstum aufweisen und auch keine Veränderungen der Morphologie besitzen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass Gds1 direkt an der Aufrechterhaltung der Polarität beteiligt ist. Zudem konnte keine spezifische Lokalisation von Gds1 an der Spitze gezeigt werden, wie es bei Bem1, Cdc24, Rac1 und Cla4 der Fall ist (Frieser et al, 2011). Es ist wahrscheinlicher,

3. Diskussion

dass Gds1 während der Initiierung des filamentösen Wachstum involviert ist. Von den humanen SmgGDS Isoformen ist bekannt, dass sie die Prenylierung und den Transport der GTPasen zur Zellmembran fördern. Hierbei bindet die Isoform SmgGDS-607 hauptsächlich an CAAX-Motive der GTPasen, welche geranyl-geranyliert werden und geht vermutlich einen Komplex mit der Geranylgeranyltransferase ein. Nach der erfolgten Prenylierung bindet die verkürzte Isoform SmgGDS-558 an die GTPase und es findet ein Transport an die Zellmembran statt (Berg et al, 2010; Schuld et al, 2014b). Da Gds1 vermutlich an das CAAX-Motiv der GTPase bindet (Abschnitt 3.1), besteht die Möglichkeit, dass Gds1 die Prenylierung der GTPase während des filamentösen Wachstums fördert, was wiederum zu einer schnelleren Bereitstellung von prenylierter GTPase führt, die an die Ziellmembran transportiert werden kann.

Eine weitere Hypothese ist, dass Gds1 als GEF während des filamentösen Wachstums wirkt und die initiale Aktivierung von Rac1 übernimmt. Bei einer Deletion von *gds1* würde die Aktivierung nach kurzer Verzögerung durch einen anderen GEF (z.B. Cdc24) erfolgen. Eine Überexpression von Gds1 zeigt allerdings keinen veränderten Phänotyp, was darauf hindeuten könnte, dass Gds1 Rac1 *in vivo* nicht aktiviert. Allerdings ist auch bekannt, dass eine sehr starke Regulation der GEFs stattfinden muss. Viele konstitutiv aktive GEFs, unter anderem SmgGDS, zeigen eine onkogene Wirkung (Hart et al, 1994; Hauser et al, 2014; Ron et al, 1989; Ron et al, 1991; Tew et al, 2008; Zhi et al, 2009). Ein Indiz für die Regulation von Gds1 könnte das schwache Fluoreszenzsignal von Gds1-GFP sein. Vom Gds1 Homolog aus *Schizosaccharomyces pombe* Arz1 (*armadillo-repeat containing zfs1 target 1*) ist bekannt, dass dessen mRNA durch das Zinkfingerprotein Zfs1 negativ reguliert wird (Cuthbertson et al, 2008). Neben dem Abbau der mRNA oder des Proteins, könnte auch eine Autoinhibierung vorliegen. Zudem könnte Gds1 eventuell durch andere Proteine inhibiert bzw. aktiviert werden. Für den *S. cerevisiae* GEF Cdc24p wurde gezeigt, dass dieser im Zellkern durch das Protein Far1p zurückgehalten wird und erst nach Phosphorylierung von Far1p ins Cytoplasma gelangt, wo er dann Cdc42p aktiviert (Nern & Arkowitz, 2000; Shimada et al, 2000). Eine weitere Erklärung könnte deshalb die Lokalisation sein, da Gds1 im Cytoplasma und nicht an der Plasmamembran lokalisiert, an welcher sich Rac1 befindet. Somit könnte es sein, dass Gds1 zunächst zu Rac1 transportiert werden muss. Eine Fusion der polybasischen Region mit dem CAAX-Motiv von Rac1 an Gds1 resultierte in einer Ko-Lokalisation beider Proteine. Findet eine Aktivierung von Rac1 durch Gds1 statt, würde entweder eine Filamentbildung erwartet werden oder, was

3. Diskussion

wahrscheinlicher ist, ein Aufblähen der Zelle, da Rac1 in der gesamten Zelle aktiviert wird und nicht nur spezifisch an der Spitze. Trotz der Ko-Lokalisation mit Rac1, zeigte die Überexpression von GFP-Gds1pbrCAAX_(Rac1) keine morphologischen Veränderungen. Grund hierfür könnte sein, dass GFP-Gds1pbrCAAX_(Rac1) an das CAAX-Motiv eines anderen GFP-Gds1pbrCAAX_(Rac1) bindet und sich diese dadurch gegenseitig blockieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass nach Prenylierung von GFP-Gds1pbrCAAX_(Rac1) und der anschließenden Verankerung in der Membran, Gds1 nicht mehr in der Lage ist, mit Rac1 zu interagieren. Womöglich könnte es aber auch sein, dass Gds1 *in vivo* keine GEF-Aktivität aufweist. Es ist bekannt, dass SmgGDS-607 zwar *in vitro* aber nicht *in vivo* die beiden GTPasen RhoA und RhoC aktivieren kann (Hamel et al, 2011). Nur die Isoform SmgGDS-558 kann auch *in vivo* beide GTPasen aktivieren und durch Aktivierung von RhoA zum Beispiel den Transkriptionsfaktor NF- κ B regulieren (Hamel et al, 2011; Hauser et al, 2014). Wie bereits erwähnt, kann Gds1^{N600A R603A} noch mit GTPasen interagieren, aber nicht mehr den Nukleotid-Austausch von Rac1 katalysieren (Abschnitt 3.1). In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Variante Gds1^{N600A R603A} die verzögerte Filamentbildung einer Δ *gds1* Mutante nicht komplementieren kann. Dies deutet daraufhin, dass Gds1 auch *in vivo* als GEF wirkt und bekräftigt die Hypothese, dass die GEF-Aktivität von Gds1 für das filamentöse Wachstum benötigt wird. Ob Gds1 dabei die GTPase Rac1 aktiviert oder vielleicht Rho1 bzw. Rho4, kann jedoch aus diesem Experiment nicht geschlossen werden, da nicht bekannt ist, ob Gds1^{N600A R603A} den Nukleotid-Austausch von Rho1 bzw. Rho4 weiterhin katalysieren kann. Da die GEF-Assays nur eine schwache Aktivierung von Rho1 und Rho4 durch Gds1 zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass während des filamentösen Wachstums vermutlich Rac1 von Gds1 aktiviert wird. Diese Hypothese wird durch frühere Untersuchungen unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass die chimäre GTPase C157R bei einer Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers ebenfalls eine verlangsamte Filamentbildung aufweist (Tillmann, 2013). Die chimäre GTPase C157R kann durch die beiden Cdc42-spezifischen GEFs Don1 und Hot1 sowie durch den Rac1-spezifischen GEF Cdc24 aktiviert werden. Außerdem ist diese chimäre GTPase in der Lage, die Einzeldelationen und Doppeldeletion von *cdc42* und *rac1* komplementieren (Tillmann, 2013). Allerdings kann diese GTPase nicht von Gds1 aktiviert werden, weshalb der verlangsamte Filamentphänotyp von C157R ein weiteres Indiz dafür sein könnte, dass Gds1 während des filamentösen Wachstums den Nukleotid-Austausch von Rac1 katalysiert und die initiale Aktivierung von Rac1 auslöst.

3. Diskussion

Ob die Aktivierung von Rac1 durch Gds1 ebenfalls für das Rac1-induzierte Filament benötigt wird, wurde mit einer Überexpression der chimären GTPase R118C untersucht, die durch Gds1 nicht aktiviert werden kann. Sowohl in $\Delta gds1$ Mutanten als auch im Wildtyp Hintergrund zeigte die Überexpression von R118C im Vergleich zu Rac1 eine verzögerte Filamentbildung. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch das Rac1-induzierte Filament von einer Rac1 Aktivierung durch Gds1 abhängig ist. Allerdings konnte nach zwei Tagen R118C Überexpression eine Stagnation der Filamentbildung beobachtet werden. Zudem waren die Filamente im Vergleich zu Rac1 induzierten Filamenten dicker. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass andere Rac1-interagierende bzw. -regulierende Proteine nicht oder nur schwach mit der chimären GTPase R118C interagieren können. Einer dieser möglichen Regulatoren könnte der GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*) Rdi1 sein. GDIs binden an den prenylierten C-Terminus der GTPase und lösen sie aus der Membran heraus und halten sie inaktiv im Zytoplasma (Sasaki et al, 1990; Wu et al, 1997b). Wenn die chimäre GTPase R118C durch eine gestörte Interaktion zu Rdi1 nicht mehr aus der Membran entfernt werden kann, könnte es zu einer Akkumulation von R118C an der Membran kommen. Ein Indiz dafür ist, dass eine Deletion von *rdi1* ebenfalls zu einer verlangsamten Filamentbildung führt (Frieser, 2011). Diese gleicht sich jedoch nach einer Zeit dem Wildtyp an, was die Hypothese widerlegt, da die R118C Überexpression zu einer Stagnation des Filaments führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Rdi1 auch einen Einfluss auf die Cdc42 Lokalisation besitzt (Frieser, 2011). Da der C-Terminus einer GTPase zudem für die Lokalisation zuständig ist, könnte es sein, dass R118C nicht korrekt lokalisiert. Während Cdc42 verstärkt an Endomembranen lokalisiert, wird Rac1 vermehrt an der Plasmamembran beobachtet (Tillmann, 2013). Mikroskopische Analysen der Filamentlänge nach 4 stündiger Überexpression von Rac1 und R118C zeigten zwar deutliche Unterschiede, es konnte jedoch auch beobachtet werden, dass bei einer Überexpression von Rac1 im $\Delta gds1$ Hintergrund deutlich weniger Zellen ein Filament gebildet haben als bei einer Überexpression von R118C. Dies deutet eher darauf hin, dass Rac1 während des Rac1-induzierten Filaments nicht durch Gds1 aktiviert wird. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, in denen z.B. weitere Zeitpunkte für die mikroskopische Untersuchung von Zellen, die R118C exprimieren, genommen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Vergleich der Überexpression der chimären GTPase C157R mit der von Rac1, da C157R auch von anderen GEFs aktiviert werden kann und in der Lage ist, den $\Delta rac1$ Phänotyp zu supprimieren.

3.3 Gds1 dient vermutlich als Gerüstprotein während der pathogenen Entwicklung

Ein Deletion von *gds1* im solopathogenen Stamm SG200AN und den kompatiblen Stämmen Bub8 und FB1 führt nach Infektion von Maispflanzen zu einer reduzierten Tumorbildung. Diese reduzierte Virulenz könnte zum einen auf die verzögerte Filamentbildung zurückzuführen sein, da diese wahrscheinlich ein verzögertes Eindringen des Pilzes in die Pflanze verursacht. Zum anderen konnte eine direkte Interaktion von Gds1 mit dem cytoplasmatischen Proteinbereich von Msb2 gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass Gds1 auch in dem Msb2-Signalweg involviert ist. Msb2 ist ein Transmembranmucin und wirkt als Sensor oberhalb der MAPK-Kaskade (Lanver et al, 2010). Bisher ist nicht bekannt, wie die Signalweiterleitung von Msb2 an die MAPK-Kaskade funktioniert. Es wird jedoch vermutet, dass die cytoplasmatische Domäne, die essentiell für die Msb2 Funktion ist, an der Signalweiterleitung beteiligt ist (Lanver, 2011). In *S. cerevisiae* agiert Msb2p zusammen mit dem Plasmamembranprotein Sho1p an der Spitze des FG (*filamentous growth*) Signalwegs, der bei Nährstoffmangel aktiviert wird und in einer Bildung von Pseudohyphen resultiert (Cullen et al, 2004; Cullen et al, 2000; Gimeno et al, 1992). Der Komplex aus Msb2p und Sho1p bringt dabei die GTPase Cdc42p mit ihrem GEF Cd24p zusammen, wodurch es zu einer Aktivierung von Cdc42p kommt. Das GTP gebundene Cdc42p kann daraufhin mit seinem Effektor, der PAK (p21-aktivierten Kinase) Ste20p interagieren. Ste20p aktiviert anschließend die MAPK-Kaskade durch Phosphorylierung der MAPKKK Ste11p (Cullen & Sprague, 2012). Interaktionsstudien konnten zeigen, dass der cytoplasmatische C-Terminus von Msb2p mit Cdc42p interagiert (Cullen et al, 2004). In *U. maydis* spielen kleine GTPasen ebenfalls eine wichtige Rolle während der pathogenitätsrelevanten MAPK-Kaskade. So interagieren zum Beispiel Rac1, Cdc42, Ras1 und Ras2 direkt bzw. indirekt mit der MAPK-Kaskade und Deletionen von *rac1*, *cdc42* und *ras2* führen jeweils zu einer Apathogenität (Bauer, 2011; Lee & Kronstad, 2002; Mahlert, 2006; Mahlert et al, 2006; Müller et al, 2003a). Basierend auf diesen Indizien wurde vermutet, dass Rho- bzw. Ras-GTPasen gute Kandidaten für die Signalweiterleitung von Msb2 wären. Da Interaktionsstudien jedoch keine Bindung von Msb2 mit Rho- bzw. Ras-GTPasen zeigten, könnten potentielle Adapterproteine involviert sein (Lanver, 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gds1 sowohl mit Rho-GTPasen (Cdc42, Rac1, Rho1, Rho2, Rho3, Rho4) als auch mit Ras-GTPasen (Ras1 und Ras2) interagieren kann. Aufgrund der direkten Interaktionen von Gds1 mit GTPasen und der cytoplasmatischen Domäne von Msb2, liegt die Vermutung

3. Diskussion

nahe, dass Gds1 eventuell als Adapterprotein zwischen Msb2 und den GTPasen fungiert. Ob Gds1 dabei die GTPase aktiviert, könnte unter anderem davon abhängen, um welche GTPase es sich handelt (siehe Abschnitt 3.1). Weiterhin besitzt Gds1 ebenso wie das Säuger-SmgGDS Armadillo-Wiederholungen (ARM) ähnlich wie β -Catenin und α -Karyopherin (Peifer et al, 1994). Vom Säuger-SmgGDS wird vermutet, dass es mit Hilfe der ARM-Domänen als Grüstprotein für mehrere Proteininteraktionen wirkt (Williams, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass SmgGDS auch mit anderen GEFs interagieren kann (Shin et al, 2006). So könnte Gds1 auch in *U. maydis* vielleicht als Grüstprotein für andere GEFs und Proteine wirken.

Da eine Doppeldeletion von *msb2* und *gds1* einen stärkeren Pathogenitätsdefekt aufweist, als die jeweiligen Einzelmутanten, ist anzunehmen, dass Gds1 noch weitere Funktionen während der pathogenen Entwicklung besitzt. Neben Msb2 agiert das Plasmamembranprotein Sho1 ebenfalls oberhalb der MAPK-Kaskade in *U. maydis*. Es wird angenommen, dass beide Proteine wahrscheinlich unabhängig voneinander agieren. So zeigen Einzelmутanten von *sho1* und *msb2* eine reduzierte Virulenz, während eine Doppeldeletionsmutante apathogen ist (Lanver et al, 2010). Aufgrund der Interaktion von Gds1 mit Sho1, könnte eine weitere Funktion von Gds1 vielleicht eine Beteiligung am Sho1-Signalweg sein. Wenn Gds1 in beiden (Msb2 und Sho1) Signalwegen involviert ist, sollte eine Deletion von *gds1* ebenfalls zu einer Apathogenität führen, wie bei der Doppeldeletion von *sho1* und *msb2*. Da dies nicht der Fall ist, ist eine direkte Gds1 Beteiligung am Sho1-Signalweg unwahrscheinlich.

Die MAPK-Kaskade wird während der pathogenen Entwicklung zweimal aktiviert. Im ersten Schritt erfolgt die Wahrnehmung des Pheromons vermutlich durch eine Weiterleitung des Signals über Ras-GTPasen zur MAPK-Kaskade, was zur Phosphorylierung von Prf1 und zum anschließenden filamentösen Wachstum führt (Kaffarnik et al, 2003; Müller et al, 2003a; Müller et al, 2003b; Zarnack et al, 2008). Im zweiten Schritt wird die MAPK-Kaskade durch Msb2 und Sho1 aktiviert, was unter anderem zur Appressorienbildung führt (Lanver et al, 2010). Sowohl $\Delta msb2$ Mutanten als auch $\Delta sho1$ Mutanten (Lanver et al, 2010) zeigen im Vergleich zu $\Delta gds1$ und den Doppeldeletionen von *gds1* und *msb2* bzw. *sho1* jedoch keine Störung in der Filamentbildung (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass Gds1 vielleicht eine weitere Funktion im ersten Schritt der MAPK-Kaskaden Aktivierung hat. Diese Aktivierung resultiert in der Bildung des *b*-induzierten Filaments und könnte der Grund für die stärker reduzierte Virulenz der Doppeldeletionen von

3. Diskussion

gds1 und *msb2* bzw. *sho1* sein. Basierend auf der Interaktion von Gds1 mit den GTPasen Ras1 und Rac1, der MAPKKK Kpp4 und dem Kpp4 interagierendem Protein Ubc2 könnte Gds1 auch hier als Gerüstprotein fungieren. Frühere Studien haben gezeigt, dass alle vier Proteine einen Einfluss auf das filamentöse Wachstum haben. So führt eine Überexpression von Ras1 oder Rac1 zu einer Filamentbildung, welches durch die Deletion von *kpp4* verhindert wird (Bauer, 2011; Mahlert et al, 2006). Von Ubc2 wiederum ist bekannt, dass der N-terminale Bereich, der mit Kpp4 und Rac1 interagieren kann, für den ersten Schritt der MAPK-Kaskaden Aktivierung wichtig ist und der C-Terminus von Ubc2 während der zweiten Aktivierung benötigt wird (Bauer, 2011; Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 2001). Das Gds1 Homolog aus *S. cerevisiae*, Bem4p, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle während des pseudohyphalen Wachstums. So konnte bei einer Deletion von *bem4* kein pseudohyphales Wachstum beobachtet werden (Lorenz et al, 2000). Zudem kann Bem4p mit Cdc42p und Ste20p interagieren, die beide zu den Hauptkomponenten des FG-Signalwegs gehören und die MAPK-Kaskade aktivieren (Drees et al, 2001; Mack et al, 1996). Da Bem4p mit vielen verschiedenen Proteinen, wie z.B. Ras- und Rho-GTPasen und Septinen, interagieren kann, wird angenommen, dass es ebenfalls als Gerüstprotein in unterschiedlichen Prozessen wirkt (Drees et al, 2001). Einer dieser Prozesse ist dabei wahrscheinlich der FG-Signalweg, der neben Msb2p, Sho1p und Ras2p auch von Bem4p reguliert wird (Cullen et al, 2004; Cullen et al, 2000; Karunanithi & Cullen, 2012; Mösch et al, 1996).

Basierend auf den in dieser Arbeit gezeigten Interaktionen von Gds1 mit GTPasen und den Komponenten der MAPK-Kaskade, kann vermutet werden, dass Gds1 wahrscheinlich als Gerüstprotein wirkt. Da die Interaktionspartner von Gds1 alle oberhalb der MAPK-Kaskade agieren bzw. die MAPKKK Kpp4 ist, wäre eine weitere Hypothese, dass Gds1 oberhalb der MAPK-Kaskade wirkt (Abb. 3.2). Ein weiteres Indiz dafür ist, dass eine Deletion von *rok1* den Pathogenitätsphänotyp einer $\Delta gds1$ Mutante supprimieren kann. Rok1 ist eine dual-spezifische Phosphatase und an der negativen Regulation der MAPK Kpp2 und Kpp6 beteiligt. Die Deletion von *rok1* führt zu einer Hypervirulenz, welche darauf zurückzuführen ist, dass Kpp2 und Kpp6 nicht mehr dephosphoryliert werden und somit konstitutiv aktiv sind (Di Stasio et al, 2009). Da die Überexpression eines kompatiblen bE/bW Heterodimers die reduzierte Filamentbildung einer $\Delta gds1$ Mutante nicht supprimieren kann, steht dies im Widerspruch mit der Hypothese, dass Gds1 als Gerüstprotein oberhalb der MAPK-Kaskade wirkt. Es könnte jedoch auch bedeuten, dass Gds1 noch eine weitere Funktion z.B. als Rac1 GEF während des filamentösen Wachstums hat (Abschnitt 3.2).

3. Diskussion

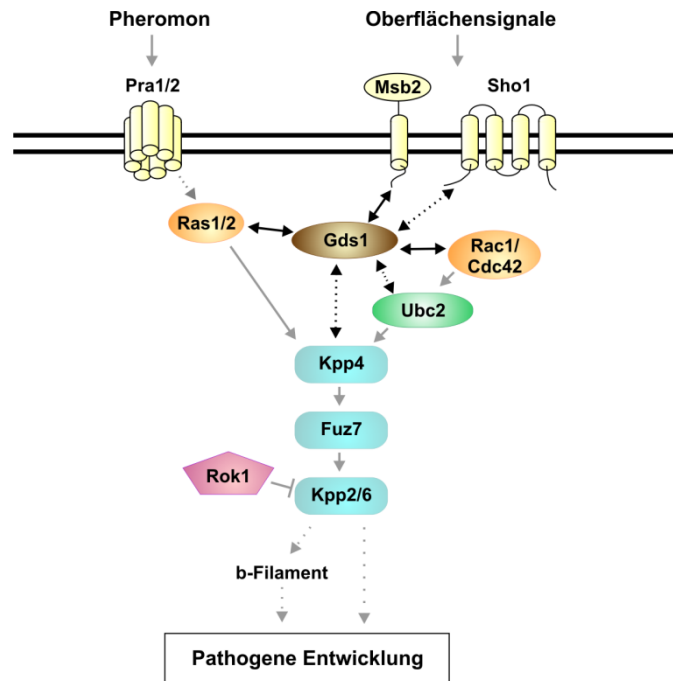


Abbildung 3.2: Modellvorstellung des möglichen Wirkungsorts von Gds1 während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Graue Pfeile zeigen die Signalwege während der pathogenen Entwicklung (nähere Erklärung siehe Text). Schwarze Doppelpfeile dagegen deuten die in dieser Arbeit gezeigten direkten (durchgezogene Linie) und indirekten (gestrichelte Linie) Interaktionen von Gds1 mit den Membranproteinen (gelb), GTPasen (orange), MAPK interagierende Proteine (grün) und MAPK (blau) an. Die dargestellten Interaktionen lassen vermuten, dass Gds1 als Gerüstprotein oberhalb der MAPK-Kaskade wirkt. (Modifiziert nach (Lanver, 2011))

3.4 Exo70 besitzt vermutlich eine teilweise redundante Funktion zu Sec3

Damit eine Pilzzelle ihre Polarität aufrechterhalten und filamentös wachsen kann, ist es notwendig, dass ein gerichteter Transport von sekretorischen Vesikeln stattfindet, durch den neues Zellwandmaterial und Proteine an die wachsende Spitze gelangen. Dieser Prozess wird vom Exozyst-Komplex vermittelt. Der Exozyst-Komplex wurde erstmals in *S. cerevisiae* entdeckt und besteht aus 8 Proteinen, von denen Sec3p und Exo70p, die Stelle an der Membran markieren, an der die Exozytose stattfinden soll (Finger et al, 1998; He et al, 2007b; TerBush et al, 1996; TerBush & Novick, 1995). Die weiteren 6 Proteine (Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p und Exo84p) binden über die Interaktion von Sec15p mit der aktiven Rab-GTPase Sec4p an die sekretorischen Vesikel und gelangen über aktiven Transport entlang von Aktinfilamenten mit den Vesikel an die Spitze, wo sie anschließend mit Sec3p und Exo70p interagieren (Boyd et al, 2004; Guo et al, 1999a; Guo et al, 1999b;

3. Diskussion

Salminen & Novick, 1989). Dadurch bringt der Exozyst-Komplex die sekretorischen Vesikel so nahe an die Plasmamembran, dass das t-SNARE Sec9p auf der Plasmamembran mit den v-SNAREs Snc1p und Snv2p auf den sekretorischen Vesikeln interagieren kann und die Fusion der Vesikel mit der Membran katalysiert (Brennwald et al, 1994; Couve & Gerst, 1994).

In *U. maydis* existieren ebenfalls alle 8 Homologe der Exozyst-Untereinheiten und auch die Rab-GTPase Sec4. Frühere Studien beschäftigten sich besonders mit dem Transport von Sec4-markierten sekretorischen Vesikel. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Langstreckentransport dieser Vesikel im Unterschied zu *S. cerevisiae* vom Mikrotubulizytoskelett abhängig ist und die Motorproteine Kin2 und Dynein, die in *U. maydis* für den anterograden bzw. retrograden Transport benötigt werden (Lehmlier et al, 1997; Wedlich-Söldner et al, 2002), involviert sind (Schink, 2010). Weiterhin wurden die Landmark-Proteine, Exo70 und besonders Sec3, näher untersucht (Schink, 2010; Wehr, 2008). Wie erwartet lokalisieren die beiden Landmark-Proteine, Sec3 und Exo70, an der wachsenden Spitze. Allerdings wiesen die Deletionsmutanten $\Delta sec3$ und $\Delta exo70$ einen unterschiedlichen Phänotyp auf. Während $\Delta sec3$ Mutanten einen starken morphologischen Defekt besaßen und nicht mehr in der Lage waren, eine normale Zellteilung zu vollziehen, zeigten $\Delta exo70$ Zellen keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Schink, 2010; Wehr, 2008). Dies deutet darauf hin, dass Sec3 als essentielles Landmark-Protein während des hefeartigen Wachstums und der Zytokinese in *U. maydis* fungiert. Neben diesen beiden Prozessen könnte der Exozyst-Komplex noch in weitere Prozesse involviert sein. Beispielsweise könnte dem Komplex eine Rolle während des filamentösen Wachstums, der Paarung (Konjugationshyphenbildung) oder der pathogenen Entwicklung zukommen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob Exo70 an einem dieser Prozesse essentiell beteiligt ist. Von Sec3 konnte bereits gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle bei allen drei Prozessen spielt wodurch die Hypothese bekräftigt wurde, dass der Exozyst-Komplex während des filamentösen Wachstums, der Paarung und der pathogenen Entwicklung beteiligt ist (Wehr, 2008). $\Delta sec3$ Mutanten konnten nur noch Filamentansätze bilden und diese waren im Vergleich zum wildtypischen *b*-abhängigen Filament deutlich dicker. Die Deletion von *exo70* führte jedoch in einem AB31 Stamm zu einer normalen *b*-Filamentbildung, was darauf hindeutet, dass Exo70 keine essentielle Komponente für das filamentöse Wachstum darstellt. Da $\Delta sec3$ Zellen noch einen Filamentansatz bilden, könnte es sein, dass Exo70 eine teilweise zu Sec3 redundante Funktion als Landmark-Protein

3. Diskussion

besitzt, diese aber nicht hinreichend ist, um ein vollständiges Filament auszubilden. Kreuzungstests haben ergeben, dass Exo70, während der Paarung von zwei kompatiblen haploiden Sporidien, keine wichtige Rolle bei der Bildung der Konjugationshyphen spielt. Die Deletion von *sec3* führt in *U. maydis* zu einer Apathogenität, was vermutlich auf die verkürzten Filamente zurückzuführen ist. Deletionsmutanten von *exo70* sind dagegen noch in der Lage ein Filament zu bilden. Dennoch könnte es sein, dass Exo70 während der pathogenen Entwicklung ein essentielles Landmark-Protein darstellt, welches für den Transport von Pilztoxinen, die in die Pflanze sekretiert werden, verantwortlich ist. Infektionsanalysen, bei denen mit Δ *exo70* Zellen infizierte Pflanzen eine ähnliche Tumorbildung aufwiesen wie Pflanzen, die mit Wildtyp Zellen infiziert wurden, widerlegten diese Hypothese jedoch. Basierend auf diesen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass Exo70 wahrscheinlich kein essentielles Landmark-Protein für die Exozytose in *U. maydis* ist. Da eine Deletion von *sec3* nicht essentiell ist, könnte es sein, dass Exo70 eine teilweise redundante Funktion zu Sec3 als Landmark-Protein hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass andere Exozyst-Komponenten diese Funktion übernehmen. So konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Sec6p und Exo84p essentiell für die Lokalisation und das Zusammenfügen des Exozyst-Komplexes sind (Songer & Munson, 2009; Zhang et al, 2005). In der vorliegenden Arbeit gelang es allerdings nicht, eine Doppeldeletionsmutante von *sec3* und *exo70* herzustellen, was auf eine synthetische Letalität hindeuten könnte und ein Indiz dafür wäre, dass Exo70 eine wichtige zu Sec3 teilweise redundante Funktion hat. Zudem zeigt die Depletion von *sec3* im Δ *exo70* Hintergrund einen stärkeren morphologischen Defekt als eine Reprimierung bzw. die Deletion von *sec3*. Dass dieser Stamm in reprimierenden (Glukose-haltigen) Medium überlebensfähig ist, könnte auf die basale Aktivität des *crg*-Promotors zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu *U. maydis* führt eine Deletion des *SEC3* Gens in *S. cerevisiae* nur zu einer temperatursensitiven Mutante während *EXO70* ein essentielles Gen ist (TerBush et al, 1996; Wiederkehr et al, 2003). Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass der N-Terminus von Sec3p essentiell für die Interaktion mit Rho-GTPasen und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), einem Bestandteil der Zellmembran, ist (Guo et al, 2001; Zhang et al, 2001; Zhang et al, 2008). Obwohl eine *sec3* Δ *N* Mutante nicht mehr in der Lage war, richtig zu lokalisieren, war kein Defekt in der Sekretion und dem Wachstum zu erkennen (Guo et al, 2001). Für Exo70p konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es über PIP_2 an die Plasmamembran bindet und dafür eine C-terminale Domäne benötigt (He et al, 2007b; Liu et al, 2007). Mutationen in diesem Bereich führten zu temperatursensitiven Mutanten und eine Kombination mit *sec3* Δ *N* zeigte,

dass diese Mutanten einen starken Wachstums- und Sekretionsdefekt haben oder sogar synthetisch letal sind (He et al, 2007a; He et al, 2007b). Aufgrund der synthetischen Letalität von *exo70-35/sec3ΔN* und *exo70-38/sec3ΔN* Mutanten wurde postuliert, dass in der Bäckerhefe die Funktion des Exozyst *targeting* von Sec3p und Exo70p gemeinsam übernommen wird (He et al, 2007b; Zhang et al, 2008). In *S. pombe* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Sec3 und Exo70 redundante Funktionen für die Lokalisation des Exozyst-Komplexes besitzen und dafür die Interaktion mit den Rho-GTPasen und PIP₂ benötigen (Bendezu et al, 2012).

3.5 Das Zusammenspiel von Sec3 und Rac1 während des polaren Wachstums

In *S. cerevisiae* wird das Landmark-Protein Sec3p durch die Rho-GTPasen Rho1p und Cdc42p reguliert (Guo et al, 2001; Zhang et al, 2001). Zum einen sind sie an der Rekrutierung von Sec3p beteiligt und zum anderen wird angenommen, dass es durch die Interaktion mit der aktiven GTPase zu einer Konformationsänderung kommt, wodurch das Andocken der sekretorischen Vesikel ermöglicht wird (Wu et al, 2008). Für die Interaktion von Sec3p mit den GTPasen ist der N-Terminus essentiell (Guo et al, 2001). Der N-Terminus besteht aus einer *pleckstrin homology* (PH) Domäne, die die Interaktion mit den GTPasen aber auch mit PIP₂ vermittelt (Baek et al, 2010; Yamashita et al, 2010). In *U. maydis* interagiert Sec3 ebenfalls mit Rho-GTPasen und vermutlich wird die Interaktion von Sec3 mit Cdc42 auch während der Zytokinese benötigt, wohingegen die Interaktion mit Rac1 für das polare Wachstum wichtig ist (Schink, 2010). Eine Deletion von *sec3* führt zu starken Polaritätsdefekten, welche denen einer *Δrac1* Mutante ähneln. Zudem sind *Δsec3* Mutanten, ähnlich wie *Δcdc42* Zellen, nicht in der Lage ein zweites Septum zu bilden (Mahlert et al, 2006; Wehr, 2008). Deshalb wurde vermutet, dass Sec3 in *U. maydis* ein Effektor sowohl von Rac1 als auch von Cdc42 ist (Schink, 2010). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rac1* nicht zu einer Delokalisation von überexprimierten Sec3-GFP führt (Schink, 2010). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Sec3 Lokalisation während des polaren Wachstums nicht von Rac1 abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit konnte durch endogen exprimiertes Sec3-3xGFP die Beobachtung bestätigt werden, dass die Lokalisation von Sec3 an der Zellspitze nicht von Rac1 abhängt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Cdc42 die Rekrutierung von Sec3 übernimmt. In *S. cerevisiae* ist neben Cdc42p auch die Rho-GTPase Rho1p an der Rekrutierung von Sec3p beteiligt (Guo et al, 2001;

3. Diskussion

Zhang et al, 2001). Es könnte somit sein, dass auch in *U. maydis* Sec3 vielleicht noch durch andere Rho-GTPasen reguliert wird. Außerdem hat Sec3 ebenfalls eine N-terminale PH-Domäne (Baek et al, 2010) und interagiert über diese wahrscheinlich mit PIP₂ an der Plasmamembran. Interessanterweise führt eine Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1^{Q61L} zu einer Delokalisation von Sec3. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* (Zhang et al, 2001) interagiert jedoch Sec3 aus *U. maydis* nicht mit der aktiven GTPase, daher kann ausgeschlossen werden, dass Sec3 von Rac1^{Q61L} direkt an der Spitze sequestriert wird. Es ist jedoch möglich, dass Rac1^{Q61L} mit anderen Sec3 bindenden Rac1 Effektoren interagiert und dadurch indirekt einen Einfluss auf die Delokalisation von Sec3 hat. Ein möglicher Effektor könnte z.B. die Aktomyosinring-Komponente Iqg1 sein, die wahrscheinlich neben der Zytokinese auch am polaren Wachstum von *U. maydis* beteiligt ist, da Iqg1 sowohl mit Rac1 interagieren kann als auch teilweise an der Spitze lokalisiert (Wehr, 2010). In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass Iqg1p mit Sec3p interagiert und an der Rekrutierung von Sec3p während der Zytokinese und der Knospung beteiligt ist (Osman et al, 2002). Ähnliche Ergebnisse zeigten Experimente in Säugetierzellen in denen IQGAP1 das Zellwachstum über die Interaktion mit dem Exozyst-Komplex reguliert (Rittmeyer et al, 2008).

Nach Überexpression von konstitutiv inaktivem Rac1^{T17N} konnte ebenfalls eine Delokalisation von Sec3 beobachtet werden. Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass Sec3 unabhängig vom Beladungszustand mit Rac1 bzw. Cdc42 interagiert (Schink, 2010), wurde in dieser Arbeit eine deutliche Interaktion von Sec3 nur mit der GDP-gebundenen GTPase beobachtet. Dies erklärt auch, warum eine Überexpression von Rac1^{T17N} zu einer erhöhten Lokalisierung von Sec3 im Cytoplasma führt, da Rac1^{T17N} vermutlich an Sec3 bindet und dort akkumuliert. Dadurch kann Sec3 nicht mehr an die Spitze gelangen. Es stellt sich jedoch die Frage, warum Sec3 gerade mit der inaktiven Form von Rac1 interagiert. Von Rac1 wird angenommen, dass es sich in seiner inaktiven Form an der gesamten Plasmamembran befindet und durch den Rac1-GEF spezifisch an der Spitze aktiviert wird (Mahlert et al, 2006). Eine Erklärung könnte sein, dass Sec3 durch die GDP-gebundene Rac1 Form rekrutiert wird. Allerdings spricht die Tatsache, dass Sec3 auch in Abwesenheit von Rac1 an der Spitze lokalisiert, gegen diese Hypothese. Zudem würde Sec3 an der gesamten Plasmamembran lokalisieren und nicht spezifisch an der Spitze. Dies wäre nur möglich, wenn Sec3 die Rekrutierung des Bem1 Komplexes (Bem1, Cdc24 und Cla4) vermittelt und somit festlegt, wo die neue Knospe gebildet werden soll. Da Bem1 jedoch auch bei einer Depletion von Sec3 weiterhin an der Spitze lokalisiert (Jaeger, 2011), spricht

3. Diskussion

dieses dagegen, dass Sec3 diesen Komplex rekrutiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Rac1 selber durch sekretorische Vesikel an die Spitze transportiert wird. In *S. cerevisiae* konnte ein ähnlicher Vorgang bereits für die GTPase Cdc42p, die essentiell für das polare Wachstum ist, gezeigt werden (Wedlich-Söldner et al, 2003). Wenn inaktives Rac1 durch sekretorische Vesikel an die Spitze gebracht werden würde, könnte Sec3 neben der Interaktion mit dem Exozyst-Komplex zusätzlich mit Rac1 interagieren, was in einer stärkeren Bindung an die sekretorischen Vesikel resultieren würde (Abb. 3.3). Durch die anschließende Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran könnte fortlaufend neues Rac1 an die wachsende Spitze gelangen und dort von Cdc24 aktiviert werden.

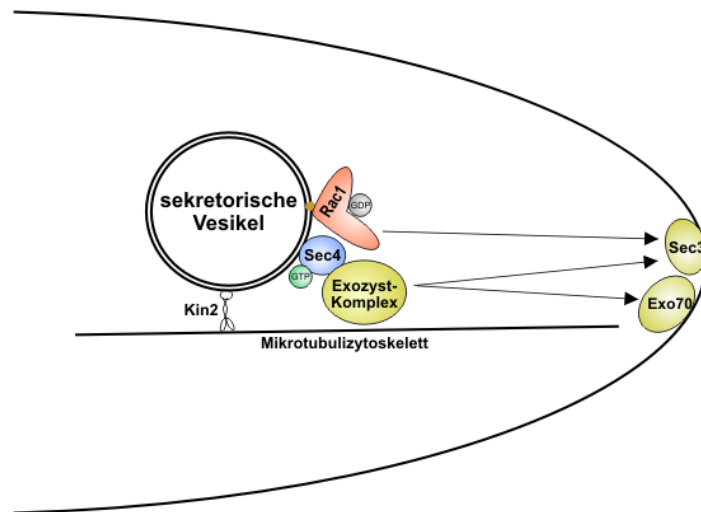


Abbildung 3.3: Modellvorstellung des Rac1 Transports durch sekretorische Vesikel an die Spitze. GDP-gebundenes Rac1 bindet an Sec4-markierte sekretorische Vesikel, die durch das Motorprotein Kin2 entlang des Mikrotubulizytoskeletts an die wachsende Spitze transportiert werden. An der Spitze interagiert der Exozyst-Komplex mit Sec3 und Exo70 um die Fusion der Vesikel mit der Membran zu vermitteln. Dies wird durch die Interaktion von Sec3 mit GDP-gebundenen Rac1 verstärkt.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 Allgemeine Materialien

Material	Bezugsquelle
Blottingpapier	Schleicher & Schüll
Cryo-Röhrchen	Roth (Karlsruhe)
Ø 16 mm Dialyseschlauch (MWCO 12,000-14,000)	Roth (Karlsruhe)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Glasperlen	Weissker®GmbH (Greiz)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Mais-Samen	Old Seed Solutions (Madison, US)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Roti®-Nylon plus-Membran	Roth (Karlsruhe)
Nitroncellulose Membran Protran BA 85	GE Healthcare
Petrischalen	Greiner, Sarstedt
Pipettenspitzen	Greiner, Sarstedt
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
schwarze Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Biozym
Vivaspin 20 MWCO 30000, Vivaspin 6 MWCO 30000, Vivaspin 6 MWCO 10000	Sartorius stedim biotech (Göttingen)
Nylon-Kugeln (HTA-924)	G. Heinemann

4.1.2 Kits

Name des Kits	Bezugsquelle
ZR Plasmid Miniprep™-Classic	ZYMO Research
Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Avegene (Hamburg)
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)

4.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Activated Charcoal	Sigmar (Deisenhofen)

4. Material und Methoden

Acrylamidmix (40:2)	Roth (Karlsruhe)
Adenin	Sigma (Deisenhofen)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Alanin	Serva (Heidelberg)
p-Aminocaprinsäure	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)
Arabinose	Merck (Darmstadt)
Arginin	Sigma (Deisenhofen)
Asparagin	Sigma (Deisenhofen)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, US)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calcofluor	Sigma (Deisenhofen)
Carboxin	Riedle-de Haen (Seelze)
Casamino Acids	Difco
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Mainland Pharmazeutische Fabrik GmbH (Frankfurt)
p-Cumarsäure	Roth (Karlsruhe)
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Hartmann Analytic
Cycloheximid	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisen(III)-Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Gentamycin	Sigma (Deisenhofen)
Geneticin	Roth (Karlsruhe)

4. Material und Methoden

Gluthation-SepharoseTM4B	Amersham GE Healthcare
Glutathion reduziert	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
GDP	Sigma (Deisenhofen)
GTPyS	Jena Bioscience
Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
Heringssperma-DNA	Sigma (Deisenhofen)
Histidin	Merck (Darmstadt)
Hygromycin B	Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)
Isoleucin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Kobaldchlorid	Merck (Darmstadt)
Kupferchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Kupfersulfat	Roth (Karlsruhe)
L-Gluthation reduziert	Roth (Karlsruhe)
L-Histidin	Roth (Karlsruhe)
Lithiumacetat	Sigma (Deisenhofen)
L-Leucin	Merck (Darmstadt)
Luminol	Fluka BioChemika
Lysin	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
mant-GDP	Jenabioscience
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Methionin	Merck (Darmstadt)
Molybdänsäure	Sigma (Deisenhofen)
clonNAT	Werner BioAgents (Jena)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)

4. Material und Methoden

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Nickelchlorid	Merck (Darmstadt)
Nutrient Broth	Difco
Orange G	Sigma (Deisenhofen)
Paraffinöl	Merck (Darmstadt)
Pepton	Difco
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenylalanin	Merck (Darmstadt)
Polyethylenglycol (PEG 3350)	Merck (Darmstadt)
Potato Dextrose Broth	Difco
Prolin	Serva (Heidelberg)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma (Deisenhofen)
Rubidiumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Serin	Roth (Karlsruhe)
Sorbitol	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Threonin	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypton	GibcoBRL Life Technologies
Tryptophan	Merck (Darmstadt)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Tyrosin	Sigma (Deisenhofen)
Uracil	Sigma (Deisenhofen)
Valin	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid	Roth (Karlsruhe)
Yeast Nitrogen Base	Difco
Zinkchlorid	Merck (Darmstadt)
Zinksulfat	Merck (Darmstadt)

4.1.4 Enzyme

Name des Enzyms	Bezugsquelle
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs (Schwalbach)

4. Material und Methoden

cComplete Tablets, Mini EDTA-free	Roche
Lysing Enzymes	Sigma (Deisenhofen)
Lysozym	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Phusion-Polymerase	Laborpräparation
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Amersham (Braunschweig), New England Biolabs (Schwalbach)
RnaseA	Serva (Heidelberg)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Roche

4.1.5 Stämme

E. coli Stämme

Für Klonierungen von DNA wurde der Stamm Top10 (Invitrogen) verwendet. Dabei handelt es sich um einen Stamm mit folgenden genetischen Marker.

Top10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
-------	---

Die *E. coli* Stämme BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Codon 3+) und Arctic Express (DE3) wurden für die Überexpression von rekombinanten Proteinen benutzt. Diese Stämme besitzen folgende genetische Marker.

BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Codon 3+)	B F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm + Tet ^R gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Camr]
Arctic Express (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm + Tet ^R gal λ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent ^R]

S. cerevisiae Stämme

Für die Klonierung über homologe Rekombination in Hefe wurde der S228c Hefestamm BY4741 (Euroscarf, Frankfurt) benutzt.

4. Material und Methoden

BY4741

MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0

Für die Hefe-zwei-Hybrid-Analysen wurde der Stamm AH109 (Clontech, Saint-Germainen-Laye/Frankfurt) verwendet.

AH109

MATa, trp1-109, leu2-3, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL1_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

***U. maydis* Stämme**

In dieser Arbeit verwendete *U. maydis* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
AB31	<i>a2 P_{crg}::bW2/bE1</i>	Phleo ^R	(Brachmann et al, 2001)
AB31 Δ sec3	<i>a2 P_{crg}::bW2/bE1 Δsec3</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	Laborsammlung
FB1	<i>a1 b1</i>		(Banuett & Herskowitz, 1989)
FB1 Δ sec3	<i>a1 b1 Δsec3</i>	Hyg ^R	Laborsammlung
Bub8	<i>a2 b4</i>		(Schulz et al, 1990)
Bub8 Δ cdc42	<i>a2 b4 Δcdc42</i>	Hyg ^R	(Mahlert et al, 2006)
Bub8 Δ cdc42 <i>P_{etef}::cdc42^{T17N}</i>	<i>a2 b4 Δcdc42</i> <i>ip^R[P_{etef}::cdc42^{T17N}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
Bub8 Δ rac1	<i>a2 b4 Δrac1</i>	Nat ^R	(Mahlert et al, 2006)
Bub8 Δ rac1 <i>P_{etef}::rac1^{T17N}</i>	<i>a2 b4 Δrac1</i> <i>ip^R[P_{etef}::rac1^{T17N}]ip^S</i>	Nat ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
Bub8 Δ sec3	<i>a2 b4 Δsec3</i>	Hyg ^R	Laborsammlung
Bub8 <i>P_{etef}::Cla4-GFP</i>	<i>a2 b4 P_{etef}::Cla4-GFP</i>	Cbx ^R	(Frieser et al, 2011)
Bub8 Exo70-GFP	<i>a2 b4 P_{exo70}::Exo70-GFP</i>	Hyg ^R	Laborsammlung

4. Material und Methoden

Bub8 Kpp4-GFP	<i>a2 b4 P_{kpp4}::Kpp4-GFP</i>	Nat ^R	Annette Freitag geb. Bauer, pers. Mitteilung
Bub8 P _{crg} :: <i>rac1</i>	<i>a2 b4 P_{crg}::rac1</i>	Nat ^R	(Mahlert et al, 2006)
Bub8 P _{etef} ::GFP- Rac1	<i>a2 b4 ip^R[P_{etef}::GFP- Rac1]ip^S</i>	Cbx ^R	(Mahlert et al, 2006)
Bub8 Sec3-GFP	<i>a2 b4 P_{sec3}::Sec3-GFP</i>	Hyg ^R	Laborsammlung
Bub8 Sec3-3HA	<i>a2 b4 P_{sec3}::Sec3-3HA</i>	Hyg ^R	Laborsammung
SG200	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i>	Phleo ^R	(Kämper et al, 2006)
SG200 Δ <i>msb2</i>	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> Δ <i>msb2</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	(Lanver et al, 2010)
SG200 Δ <i>rok1</i>	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> Δ <i>rok1</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	(Di Stasio et al, 2009)
SG200 Δ <i>sho1</i>	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> Δ <i>sho1</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	(Lanver et al, 2010)
SG200 Δ <i>sho1</i> Δ <i>msb2</i>	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> Δ <i>sho1</i> Δ <i>msb2</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	(Lanver et al, 2010)
SG200AM-mCherry	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> <i>ip^R[P_{um01779}::mCherry]ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
SG200AM-mCherry Δ <i>sec3</i>	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> Δ <i>sec3</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	Laborsammlung
SG200AN	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> <i>P_{um01779}::GFP</i>	Phleo ^R , Nat ^R	Johannes Freitag, pers. Mitteilung
SG200AN Δ <i>gds1</i>	<i>a1::mfa2 bW2/bE1</i> <i>P_{um01779}::GFP</i> Δ <i>gds1</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R	Johannes Freitag, pers. Mitteilung

4. Material und Methoden

In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme

Alle hergestellten Stämme wurden durch Southern Blot verifiziert. Deletionsmutanten wurden zusätzlich durch Kontroll-PCRs auf den ORF des jeweiligen Gens kontrolliert.

Stamm	benutztes Plasmid	Resistenz	Ausgangsstamm
AB31 Δ exo70	pRS426 Δ exo70 (G418)	G418 ^R	AB31
AB31 Δ gds1	pJet1.2 Δ gds1 (Hyg)	Hyg ^R	AB31
AB31 Δ gds1 P _{gds1} ::Gds1	pDL127	Hyg ^R , Cbx ^R	AB31 Δ gds1
AB31 P _{gds1} ::Gds1-GFP	pRS426 Gds1-GFP (G418)	G418 ^R	AB31
FB1 Δ exo70	pRS426 Δ exo70 (G418)	G418 ^R	FB1
FB1 Δ gds1	pJet1.2 Δ gds1 (Hyg)	Hyg ^R	FB1
FB1 Δ gds1 P _{gds1} ::Gds1	pDL127	Hyg ^R , Cbx ^R	FB1 Δ gds1
Bub8 Δ cdc42 P _{sec3} ::Sec3-3xGFP	pRS426 Sec3-3xGFP (G418)	Hyg ^R , G418 ^R	Bub8 Δ cdc42
Bub8 Δ cdc42 P _{etef} ::cdc42 ^{T17N} P _{sec3} ::Sec3-3xGFP	pRS426 Sec3-3xGFP (G418)	Hyg ^R , Cbx ^R , G418 ^R	Bub8 Δ cdc42 P _{etef} ::cdc42 ^{T17N}
Bub8 Δ exo70	pRS426 Δ exo70 (G418)	G418 ^R	Bub8
Bub8 Δ exo70 P _{crg} ::Sec3	pRS426 P _{crg} ::Sec3 (G418)	Hyg ^R , G418 ^R	Bub8 Δ exo70
Bub8 Δ gds1	pJet1.2 Δ gds1 (Hyg)	Hyg ^R	Bub8
Bub8 Δ gds1 P _{crg} ::R118C	pRS426 P _{crg} ::R118C (G418)	Hyg ^R , G418 ^R	Bub8 Δ gds1
Bub8 Δ gds1	pDL127	Hyg ^R , Cbx ^R	Bub8 Δ gds1

4. Material und Methoden

$P_{gds1}::Gds1$

Bub8 $\Delta rac1$ $P_{sec3}::sec3-3xGFP$	pRS426 Sec3-3xGFP (Hyg)	Nat ^R , Hyg ^R	Bub8 $\Delta rac1$
Bub8 $\Delta rac1$ $P_{etef}::rac1^{T17N}$ $P_{sec3}::Sec3-3xGFP$	pRS426 Sec3-3xGFP (Hyg)	Nat ^R , Hyg ^R	Bub8 $\Delta rac1$ $P_{etef}::rac1^{T17N}$
Bub8 $P_{etef}::GFP-$ Cdc42	pETEF-GFP-Cdc42	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-$ Msb2 ⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰	pETEF-GFP- Msb2 ⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-Ras1$	pETEF-GFP-Ras1	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-Ras2$	pETEF-GFP-Ras2	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-Rho1$	pETEF-GFP-Rho1	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-Rho2$	pETEF-GFP-Rho2	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-Rho3$	pETEF-GFP-Rho3	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{etef}::GFP-Rho4$	pETEF-GFP-Rho4	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{crg}::gds1$	pRS426 $P_{crg}::Gds1$ (Hyg)	Hyg ^R	Bub8
Bub8 $P_{crg}::GFP-Gds1-$ pbrCAAX _(rac1)	pCRG-GFP-Gds1- pbrCAAX _(rac1)	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{crg}::GFP-Ubc2$	pCRG-GFP-Ubc2	Cbx ^R	Bub8
Bub8 $P_{crg}::R118C$	pRS426 $P_{crg}::R118C$ (G418)	G418 ^R	Bub8
Bub8 $P_{crg}::rac1 \Delta gds1$	pJet1.2 $\Delta gds1$ (Hyg)	Nat ^R , Hyg ^R	Bub8 $P_{crg}::Rac1$
Bub8 $P_{crg}::rac1$	pRS426 Sec3-3xGFP	Nat ^R , Hyg ^R	Bub8 $P_{crg}::Rac1$

4. Material und Methoden

$P_{sec3}::Sec3$ -3xGFP	(Hyg)		
Bub8 $P_{gds1}::Gds1$ -GFP	pRS426 $Gds1$ -GFP (G418)	G418 ^R	Bub8
Bub8 $P_{sec3}::Sec3$ -3xGFP	pRS426 $Sec3$ -3xGFP (Hyg)	Hyg ^R	Bub8
Bub8 $P_{sec3}::Sec3$ -3xGFP $P_{crg}::cdc42^{Q61L}$	pRU11- $Cdc42^{Q61L}$	Hyg ^R , Cbx ^R	Bub8 $P_{sec3}::Sec3$ -3xGFP
Bub8 $P_{sec3}::Sec3$ -3xGFP $P_{crg}::rac1^{Q61L}$	pRU11- $Rac1^{Q61L}$	Hyg ^R , Cbx ^R	Bub8 $P_{sec3}::Sec3$ -3xGFP
SG200 $\Delta gds1$	pJet1.2 $\Delta gds1$ (G418)	Phleo ^R , G418 ^R	SG200
SG200 $\Delta msb2 \Delta gds1$	pJet1.2 $\Delta gds1$ (G418)	Phleo ^R , Hyg ^R , G418 ^R	SG200 $\Delta msb2$
SG200 $\Delta msb2 \Delta gds1 \Delta rok1$	pDL38	Phleo ^R , Hyg ^R , G418 ^R , Cbx ^R	SG200 $\Delta msb2 \Delta gds1$
SG200 $\Delta sho1 \Delta gds1$	pJet1.2 $\Delta gds1$ (G418)	Phleo ^R , Hyg ^R , G418 ^R	SG200 $\Delta sho1$
SG200 $\Delta sho1 \Delta gds1 \Delta rok1$	pDL38	Phleo ^R , Hyg ^R , G418 ^R , Cbx ^R	SG200 $\Delta sho1 \Delta gds1$
SG200 $\Delta sho1 \Delta msb2 \Delta gds1$	pJet1.2 $\Delta gds1$ (G418)	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R G418 ^R	SG200 $\Delta sho1 \Delta msb2$
SG200 $\Delta sho1 \Delta msb2 \Delta gds1 \Delta rok1$	pDL38	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R G418 ^R , Cbx ^R	SG200 $\Delta sho1 \Delta msb2 \Delta gds1$
SG200 $\Delta rok1 \Delta gds1$	pJet1.2 $\Delta gds1$ (G418)	Phleo ^R , Hyg ^R , G418 ^R	SG200 $\Delta rok1$
SG200AM-mCherry	pRS426 $\Delta exo70$ (Hyg)	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200AM-mCherry

4. Material und Methoden

Δ exo70		Hyg ^R
SG200AN Δ gds1	pDL127	Phleo ^R , Hyg ^R , SG200AN Δ gds1
P _{gds1} ::Gds1-GFP		Cbx ^R
SG200AN Δ gds1	p123-P _{gds1} ::Gds1 ^{N600A R603A}	Phleo ^R , Hyg ^R , SG200AN Δ gds1
P _{gds1} ::Gds1 ^{N600A R603A}		Cbx ^R

Maisvarietäten (Zea mays sp.)

Für alle Pflanzeninfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet

4.1.6 Plasmide und Primer

Im Folgenden werden alle Plasmide beschrieben, die für diese Arbeit benötigt wurden. Die selbst hergestellten Plasmide wurden mit Hilfe von Restriktionsanalyse bestätigt. Desweiteren wurden die durch PCR-Amplifikation eingebrachte Fragmente mittels Sequenzierung, der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg), auf ihre Korrektheit hin überprüft.

Plasmide für die Transformation in *U. maydis*

In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pCRG-Ala-GFP-MMXN	Amp ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
pCRG-GFP-Ubc2	Amp ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
pDL38-pCR2.1-TOPO- Δ rok1-Cbx ^R	Amp ^R , Cbx ^R	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pDL127 (p123 P _{gds1} ::Gds1)	Amp ^R , Cbx ^R	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pDL128 (p123 P _{gds1} ::Gds1-GFP)	Amp ^R , Cbx ^R	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pETEF-Ala-GFP-MMXN	Amp ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
pETEF-Ala-mKate-MMXN	Amp ^R , Cbx ^R	Laborsammlung

4. Material und Methoden

pEtef-GFP-Cdc42	Amp ^R , Cbx ^R	Laborsammlung
pHA (Hyg)	Amp ^R , Hyg ^R	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pJet1.2	Amp ^R	Fermentas
pJet1.2 $\Delta gds1$ (Hyg)	Amp ^R , Hyg ^R	Johannes Freitag, pers. Mitteilung
pMF1H	Amp ^R , Hyg ^R	(Brachmann et al, 2004)
pMF1G	Amp ^R , G418 ^R	(Baumann et al, 2012)
pMF2-1H	Amp ^R , Hyg ^R	(Brachmann et al, 2004)
pMF5-1H	Amp ^R , Hyg ^R	(Becht et al, 2006)
pMF5-4h	Amp ^R , Hyg ^R	(Baumann et al, 2012)
pRS426	Amp ^R , Ura	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS426 $\Delta exo70$	Amp ^R , Ura, Hyg ^R	Laborsammlung
pRS426 $\Delta sec3$	Amp ^R , Ura, Hyg ^R	Laborsammlung
pRS426 Sec3-3xGFP (Hyg)	Amp ^R , Ura, Hyg ^R	Laborsammlung
pRS426 Sec3-3HA (Hyg)	Amp ^R , Ura, Hyg ^R	Laborsammlung
pRS426 Exo70-GFP (Hyg)	Amp ^R , Ura, Hyg ^R	Laborsammlung
pRU11 Δ NotI-Cdc42 ^{Q61L}	Amp ^R , Cbx ^R	(Mahlert et al, 2006)
pRU11 Δ NotI-Rac1 ^{Q61L}	Amp ^R , Cbx ^R	(Mahlert et al, 2006)

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.

Die nachfolgenden Plasmide dienen unter anderem zur Generierung von Deletionsmutanten und konditionalen Mutanten, die unter der Kontrolle des Arabinose/Glukose regulierbaren *crg*-Promotor stehen. Desweiteren dienen einige Plasmide aber auch zur Herstellung von C-terminalen bzw. N-terminalen GFP-Fusionsproteinen, dessen Expression entweder unter der

4. Material und Methoden

Kontrolle der eigenen Promotoren steht oder durch den *crg*-Promotor bzw. den konstitutive aktiven *etef*-Promotor reguliert wird. Alle hergestellten Plasmide besitzen eine Ampicillin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*. Die Selektion in *U. maydis* findet durch unterschiedliche Antibiotika (Carboxin, Hygromycin und Geneticin) statt. Bevor es zu einer Transformation von *U. maydis* kommt, werden die Konstrukte durch das Restriktionsenzym SspI linearisiert bzw. ausgeschnitten.

p123-P_{gds1}::Gds1^{N600A R603A}

Dieses Plasmid dient zur Expression des veränderten Gds1^{N600A R603A} Proteins, welches keine GEF-Aktivität mehr besitzt und unter der Kontrolle des *gds1*-Promotors steht. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenz des Plasmids pDL127.

Zur Herstellung dieses Konstrukt wurde das Plasmid pGex4T-1 Gds1^{N600A R603A} mit den Restriktionsenzymen XbaI und NotI geschnitten und das C-terminale Ende von Gds1^{N600A R603A} in den mit XbaI/NotI geschnittenen Vektor pDL127 (p123 P_{gds1}::Gds1) ligiert.

pCRG-GFP-Gds1-pbrCAAX_(rac1)

Dieses Plasmid dient zur Herstellung einer N-terminalen GFP-Fusion von Gds1, welches am C-terminus die polybasische Region mit CAAX-Box von Rac1 besitzt. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den *crg*-Promotor reguliert. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenz des Plasmids pCRG-Ala-GFP-MMXN.

Herstellung:

MH588 bem4sacII_fwd	cgatccgcgccatgaggactgcactgggtcttctcg
MH741 bem4polycaax_rev	agcggcgccgcttaaagaatcatagctgttcttcttctactc
	ttgactgggtgaacagtggcgatcttggtgacgg

Mit Hilfe des *reverse* Primer wurde durch PCR an den Gds1 ORF die polybasische Region mit CAAX-Box von Rac1 fusioniert. Das erhaltende PCR-Produkt wurde dann mit den Restriktionsenzymen SacII/NotI geschnitten und in den mit SacII/NotI offenen pCRG-Ala-GFP-MMXN Vektor ligiert.

pETEF-GFP-Msb2⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰

Dieses Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion der Aminosäuren 915-1140 des Transmembranproteins Msb2 unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenz des Plasmids pETEF-Ala-GFP-MMXN.

Herstellung:

4. Material und Methoden

MG591 msb2_sma1_fw	cgatcccgggcatgcgcaagcatcgcaagggcc
MG562 Msb2tail_Stop_NotI_rev	ctagcggcgccgcttaaaggagaaccgagttgc

Die Aminosäuren 915-1140 von Msb2 wurde mittels einer PCR amplifiziert und das erhaltende Fragment mit den Restriktionsenzymen SmaI und NotI geschnitten. Das anschließend erhaltende Fragment wurde dann in den mit MscI und NotI geschnittenen pETEF-Ala-GFP-MMXN Vektor ligiert.

pETEF-GFP-Ras1, pETEF-GFP-Ras2, pETEF-GFP-Rho2, pETEF-GFP-Rho3, pETEF-GFP-Rho4

Diese Plasmide dienen zur Herstellung einer N-terminalen GFP-Fusion der Ras-GTPasen Ras1 und Ras2 und der Rho-GTPasen Rho2, Rho3 und Rho4 (Um05734). Das Fusionsprotein wird hierbei unter der Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenz des Plasmids pETEF-Ala-GFP-MMXN.

Herstellung:

MH392 Ras1_mscIIndel_fw	ctgatggccacccatattgtccaaagcacaattcttgcgagag
MH393 Ras1_notI_rev	gatcgcgccgcttagagaacgatacatttctggcagc
MH394 Ras2_mscI_fw	ctgatggccacccatgagtggaatgatgatctac
MH395 Ras2_notI_rev	gatcgcgccgctcaaaggatattgcattttgacttc
MH378 Rho2_mscIIndel_fw	ctgatggccacccatattggcaccggcagcaattcgtagg
MH379 Rho2_notI_rev	gatcgcgccgcttagaggacgatacatttgaagagcc
MH376 Rho3_mscIIndel_fw	ctgatggccacccatattgacgtgtgcggacttgtgc
MH377 Rho3_notI_rev	gatcgcgccgctcaggcgatggtgcaggcacgag
MH374 Rho4_mscI_fw	ctgatggccacccatgtctgaactccgccgaaagc
MH375 Rho4_notI_rev	gatcgcgccgcttagagaacggtgcaaccttcttc

Die offenen Leserahmen der jeweiligen GTPasen wurde mittels einer PCR auf c-DNA amplifiziert und die erhaltenden Fragmente mit den Restriktionsenzymen MscI und NotI geschnitten. Danach wurden sie in den mit MscI und NotI geschnittenen pETEF-Ala-GFP-MMXN Vektor ligiert.

pETEF-GFP-Rho1

Dieses Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion der Rho-GTPase Rho1 (Um10663) unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenz des Plasmids pETEF-Ala-GFP-MMXN.

4. Material und Methoden

Herstellung:

MH380 Rho1_SmaI_NdeI_fwd	ctgacccggggcccatatgaacggttacaacagtggctc
MH381 Rho1_notI_rev	gatcgcgccgctcacagcaaaacgcacttcttttggcg

Der Rho1 ORF wurde mittels einer PCR auf c-DNA amplifiziert und das erhaltende Fragment mit den Restriktionsenzymen SmaI und NotI geschnitten. Das erhaltende Fragment wurde dann in den mit MscI und NotI geschnittenen pETEF-Ala-GFP-MMXN Vektor ligiert.

pJet1.2 $\Delta gds1$ (G418)

Dieses Plasmid dient zur Herstellung einer *gds1*-Deletionsmutante. Hierbei wird der offene Leserahmen von *Gds1* durch eine Geneticin-Resistenzkassette ersetzt.

Zur Herstellung des Konstrukts wurde das Plasmid pJet1.2 $\Delta gds1$ (Hyg) mit dem Restriktionsenzym SfiI aufgeschnitten und die Hygromycin-Resistenzkassette mit der Geneticin-Resistenzkassette von pMF1g ausgetauscht.

pMF2-1g

Dieses Plasmid dient der Gewinnung einer SfiI-Kassette, welche eine Geneticin-Resistenz und den Arabinose/Glukose regulierbaren *crg*-Promotor besitzt.

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde das Plasmid pMF2-1H mit dem Restriktionsenzym NotI aufgeschnitten und die Hygromycin-Resistenzkassette gegen die Geneticin-Resistenzkassette von pMF1g ausgetauscht.

pMF5-1g

Das Plasmid dient zur Gewinnung einer SfiI-Kassette, welche den offenen Leserahmen von GFP mit nos Terminator und eine Geneticin-Resistenz besitzt.

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde das Plasmid pMF5-1H mit dem Restriktionsenzym NotI aufgeschnitten und die Hygromycin-Resistenzkassette mit der Geneticin-Resistenzkassette, aus pMF1g, ausgetauscht.

pRS426 $\Delta exo70$ (G418)

Dieses Plasmid dient zur Herstellung einer *exo70*-Deletionsmutante. Hierbei wird der offene Leserahmen von *Exo70* durch eine Geneticin-Resistenzkassette ersetzt.

Zur Herstellung des Konstruktes wurde das Plasmid pRS426 $\Delta exo70$ (Hyg) mit dem Restriktionsenzym SfiI aufgeschnitten und die Hygromycin-Resistenzkassette gegen die Geneticin-Resistenzkassette von pMF1g ausgetauscht.

4. Material und Methoden

pRS426 Gds1-GFP

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer C-terminalen GFP-Fusion von Gds1 am genomischen Lokus. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Geneticin-Resistenz des Plasmids pMF5-1g.

Herstellung:

Linke Flanke

MG 655 LF_Bem4orf_fw

gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattggtcgg
ctggacgtgatcgacgcagttgtcgg

MG656 LF_bem4orf_rev

cccttgctcacatggtggccgcgttggccgcaacagtggc
gatcttggtgacggcgtggagcgcg

Rechte Flanke

MG657 RF_delbem4_fw

gtgcggccgcattaataggcctgagtgccctcaacatgcaa
tgcatacattgcccgc

MG658 RF_delbem4_rev

gcggataacaattcacacaggaaacagcaatattctgtgg
tgcttgtagtgcgcgcgac

Die durch PCR amplifizierten Flanken wurden mit der geschnittenen SfiI-Kassette (von pMF5-1g) und KpnI/BamHI offenen pRS426 in *S. cerevisiae* transformiert und mittels *Drag and Drop* (siehe Kapitel 4.2.2) wurde das pRS426 Gds1-GFP Plasmid generiert.

pRS426 P_{crg}::gds1 (Hyg)

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer konditionalen *gds1* Mutante. Hierbei wird der endogene Gds1-Promotor durch den *crg*-Promotor ersetzt. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF2-1H.

Herstellung:

Linke Flanke

MH382 LF bem4_fwd

gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattcctgttca
caaagacggctaggtgcctgagtg

MH383 LF_bem4_rev

attgtcacgccatggtggccatctaggcccttgacacaaag
agcgcgaggctgtccgtgtgagc

Rechte Flanke

MH384 RF_Orfbem4_fwd

aaaaagataaccataataggcctgagtgccatgaggacttg
cactggtgcttctcgagcccgtcc

MH385 RF_Orfbem4_rev

gcggataacaattcacacaggaaacagcaatattcctgcac
cactcgccaggcccagctggagacg

Die durch PCR amplifizierten Flanken wurden mit der geschnittenen SfiI-Kassette (von pMF2-1H) und KpnI/BamHI offenen pRS426 in *S. cerevisiae* transformiert und mittels *Drag and Drop* (siehe Kapitel 4.2.2) wurde das pRS426 P_{crg}::gds1 (Hyg) Plasmid generiert.

4. Material und Methoden

pRS426 P_{crg}::Sec3 (G418)

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer konditionalen *sec3* Mutante. Hierbei wird der endogene Sec3-Promotor durch den Arabinose/Glukose regulierbaren *crg*-Promotor ersetzt. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Geneticin-Resistenz des Plasmids pMF2-1g. Zur Herstellung des Konstruktes wurde das Plasmid pRS426 P_{crg}::Sec3 (Hyg) mit dem Restriktionsenzym SfiI aufgeschnitten und der *crg*-Promotor mit der Hygromycin-Resistenzkassette gegen das SfiI-Konstrukt von pMF2-1g ausgetauscht.

pRS426 P_{crg}::R118C (G418)

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer chimären GTPase, welche aus den ersten 118 Aminosäuren von Rac1 besteht und die restlichen Aminosäuren von Cdc42 besitzt. Durch homologe Rekombination wird das Konstrukt in den Rac1 Lokus eingebracht was gleichzeitig zu einer Deletion von *rac1* führt. Die Expression von R118C steht unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Geneticin-Resistenz des Plasmids pMF2-1g.

Herstellung:

Linke Flanke

MH694_LF_rac1_fwd	gtaacgccagggtttccagtcacgacgaatattcagcatt
	cacgattcacgattcacgattcacg
MH695 LF_rac1_rev	attgtcacgccatgttgccatctaggccgattgcgagtgtga
	atacagagagcgagggc

Mittel Flanke

MH696 LF_rac1ORF_fw	aaaaagataaccataataggcctgagtgccatgcagacat
	caagtgtgtagtcgtcgagacg
MH697 C42_Rac1loki_rev	ccacgaaaccatctgcgtgttcgcttctactctcagagaatg
	gcgcacttgacttcttcg

Rechte Flanke

MH698 C42_Rac1loki_fwd	ccgcaagaagtccaagtgcgccattctctgagagtgaacgc
	gaacacgcagatggttcgtg
MH699 RF_rac1_rev	gcggataacaattcacacaggaaacagcaatattctgggaa
	catggtctggtgtagcagagg

Die linke und rechte Flanke wurde durch PCR auf genomischer DNA amplifiziert und besitzen beide ca. 29 bp Homologieregion zu dem pRS426 Vektor. Die linke Flanke besitzt ebenso wie die mittlere Flanke noch eine 29 bp Homologieregion zu der SfiI Kassette von pMF2-1g. Für die mittlere Flanke diente das Plasmid pGEX4T-1 R118C als Template der PCR. Diese besitzt ebenso wie die rechte Flanke Homologieregionen zu dem 3'Ende vom Rac1 Lokus und zum C-terminus von Cdc42. Alle drei Flanken wurden zusammen mit der

4. Material und Methoden

SfiI-Kassette und den KpnI/BamHI geschnittenen pRS426 in *S. cerevisiae* eingebracht. Hier wurde dann durch homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem pRS426 Vektor das Plasmid pRS426 P_{org}::R118C (G418) generiert.

pRS426 Sec3-3xGFP (G418)

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer C-terminalen 3xGFP-Fusion von Sec3 am genomischen Lokus. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Geneticin-Resistenz des Plasmids pMF1g.

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde das Plasmid pRS426 Sec3-3xGFP (Hyg) mit dem Restriktionsenzym NotI aufgeschnitten und die Hygromycin-Resistenzkassette gegen die Geneticin-Resistenzkassette von pMF1g ausgetauscht.

Plasmide für die Transformation in *S. cerevisiae*

In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pGADT ₇	Amp ^R , Leu	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich
pGADT ₇ msb2 ⁹¹⁵⁻¹¹⁴⁰	Amp ^R , Leu	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇	Kan ^R , Trp	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich
pGBKT ₇ cdc42 ^{-CAAX}	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ sho1 ¹³¹⁻³³⁵	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ rac1 ^{-CAAX}	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ ras1 ^{-CAAX}	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ rho1 ^{-CAAX}	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ rho2 ^{-CAAX}	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ rho3 ^{-CAAX}	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung
pGBKT ₇ ubc2	Kan ^R , Trp	Daniel Lanver, pers. Mitteilung

4. Material und Methoden

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Diese Plasmide dienen zur Expression von Proteinen, welche in einer Hefe-zwei-Hybrid Analyse auf ihre Interaktion mit anderen Proteinen getestet wurden. Zur Herstellung der nachfolgenden Plasmide wurden die Ausgangsplasmide pGADT₇ und pGBKT₇ benutzt. Das Plasmid pGADT₇ enthält die GAL4 Aktivierungsdomäne mit einem HA Epitop und wird auf Ampicillin selektioniert. Zur Selektion in Hefe besitzt es außerdem noch einen LEU2 Auxotrophiemarker. Das Plasmid pGBKT₇ besitzt die GAL4 Bindedomäne mit einem Myc Epitop und wird in *E. coli* auf Kanamycin selektioniert. Die Selektion in Hefe findet durch den TRP1 Auxotrophiemarker statt.

pGADT₇Gds1

Dieses Plasmid dient der Expression von Gds1, fusioniert mit der GAL4 Aktivierungsdomäne.

Herstellung:

MG447 bem4_nde1_fw	cgatcatatgaggactgcactggtgcttctcgagccc
MG448 bem4_ecori_rev	gatcgaattctcaaacagtggcgatcttggtgacgg

Der offene Leserahmen von Gds1 wurde mittels PCR amplifiziert. Das erhaltende Fragment wurde dann mit NdeI/EcoRI geschnitten und in die NdeI/EcoRI Schnittstelle des pGADT₇ Vektors ligiert.

pGBKT₇Gds1

Dieses Plasmid dient der Expression von Gds1, fusioniert mit der GAL4 Bindedomäne.

Herstellung:

MG447 bem4_nde1_fw	cgatcatatgaggactgcactggtgcttctcgagccc
MG448 bem4_ecori_rev	gatcgaattctcaaacagtggcgatcttggtgacgg

Der offene Leserahmen von Gds1 wurde mittels PCR amplifiziert. Das erhaltende Fragment wurde dann mit NdeI/EcoRI geschnitten und in die NdeI/EcoRI Schnittstelle des pGBKT₇ Vektors ligiert.

pGBKT₇Ras2^{-CAAX}

Dieses Plasmid dient der Expression von Ras2, fusioniert mit der GAL4 Bindedomäne.

Herstellung:

MG461 Ras2_NdeI_fw	tatcatatgagtggcaaatgatgatctacaagcttggtg
MG462 Ras2_EcoRI_rev	tatgaattCtcaacttttgacttcttctcctttgtgcg

4. Material und Methoden

Der offene Leserahmen von Ras2 wurde mittels PCR auf c-DNA amplifiziert. Das erhaltende Fragment wurde dann mit NdeI/EcoRI geschnitten und in die NdeI/EcoRI Schnittstelle des pGBKT₇ Vektors ligiert.

pGBKT₇ Rho4^{-CAAX}

Dieses Plasmid dient der Expression von Rho4, fusioniert mit der GAL4 Bindedomäne.

Herstellung:

MG975 05734 EcoRI/NdeI fw	ctgagaattccatatgtctgaactccgccgaaagc
MG976 05734 NotI rev	ctagcggcgccgctcaactacctttctcctcgagccacggc

Der offene Leserahmen von Rho4 wurde mittels PCR auf c-DNA amplifiziert. Das erhaltende Fragment wurde dann mit NdeI/NotI geschnitten und in die NdeI/NotI Schnittstelle des pGBKT₇ Vektors ligiert.

Plasmide für die Herstellung von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pGEX4T-1	Amp ^R	GE Healthcare
pGEX4T-1 Um Cdc42	Amp ^R	(Hlubek et al, 2008)
pGEX4T-1 R118C	Amp ^R	Britta Tillmann, pers. Mitteilung
pGEX4T-1 R15C	Amp ^R	Britta Tillmann, pers. Mitteilung
pGEX4T-1 Um Rac1	Amp ^R	(Hlubek et al, 2008)
pGEX4T-1 Rac1 ^{T17N}	Amp ^R	(Frieser et al, 2011)

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.

Die nachfolgenden Plasmide dienen zur Expression von rekombinanten Proteinen, die eine N-terminale GST-Fusion besitzen. Als Ausgangsplasmide diente das Plasmid pGEX4T-1 und dessen Derivate pGEX4T-1 Gds1, pGEX4T-1 UmCdc42 und pGEX4T-1 UmRac1, welche durch EcoRI/NotI in den Vektor eingebracht wurden und eine zusätzliche NdeI Schnittstelle nach der EcoRI Schnittstelle einfügten. Die Expression der rekombinanten Proteine steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Laktose oder IPTG stimuliert werden kann. Als Selektionsmarker in *E. coli* dient die Ampicillin-Resistenz des Vektors pGEX4T-1.

4. Material und Methoden

pGEX4T-1 Cdc42^{Q61L}

Dieses Plasmid dient zur Herstellung von rekombinanten GST-Cdc42^{Q61L}.

Herstellung:

MG908 NdeI for

gatccatatgcagaccatcaagtgtgt

MG078 NotI rev

gatcgcgggccgctcagagaatggcgccactggac

Der offene Leserahmen von Cdc42^{Q61L} wurde mittels einer PCR auf den Vektor pRU11Cdc42^{Q61L} amplifiziert und das erhaltende Fragment mit den Restriktionsenzymen NdeI/NotI geschnitten. Dieses wurde dann in den mit NdeI/NotI geöffneten pGEX4T-1 Gds1 Vektor ligiert.

pGEX4T-1 Cdc42^{T17N}

Dieses Plasmid dient zur Herstellung von rekombinanten GST-Cdc42^{T17N}.

Herstellung:

MH261 Cdc42 T17N_fw

ggagatgggtcggtcggtgaagaactgcctgttgatctcgtaacc

MH262 Cdc42 T17N_rev

ggtgtacgagatcaacaggcagttcttaccgaccgcaccatctcc

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde eine Quick Change PCR mit dem oben genannten Primer durchgeführt. Als Template diente das Plasmid pGEX4T-1 UmCdc42.

pGEX4T-1 Gds1

Dieses Plasmid dient zur Expression von rekombinanten GST-Gds1.

Herstellung:

MG559 Bem4_EcoRI_fw

ctgagaattccatatgaggacttgactgggtgc

MG560 Bem4_Stop_NotI_rev

ctagcggcgccgctcaaacagtgccgatcttggtgacg

Der offene Leserahmen von Gds1 wurde mittels einer PCR amplifiziert und das erhaltende Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI/NotI geschnitten. Dieses wurde dann in den mit EcoRI/NotI geöffneten pGEX4T-1 Vektor ligiert.

pGEX4T-1 Gds1^{M562A}, pGEX4T-1 Gds1^{N600A}, pGEX4T-1 Gds1^{R603A}, pGEX4T-1Gds1^{N600A R603A}

pGEX4T-1 Gds1^{N643A}

Diese Plasmide dienen zur Expression von verschiedenen rekombinanten GST-Gds1 Mutanten.

Herstellung:

Linkes Fragment

MG559 Bem4_EcoRI_fw

ctgagaattccatatgaggacttgactgggtgc

MG901 bem4_M562A_rev

cgagccgctgaacagctcgaccgcattcgagtcgtctccagag

4. Material und Methoden

MH501 Bem4N600A_rev	tgatcatcgctgcgcgccaagcgccgagggctagcattccgc
MH503 Bem4R603A_rev	cttaagcagtgatcatcgctggccgccaattgcccaggggcta
MG903 bem4_N600A_R603A_rev	cttaagcagtgatcatcgctggccgccaagcgccgaggggctag
	cattccgc
MG904 bem4_N643A_rev	ggcggctgggatcgacagagccttaagaagcgagacgag

Rechtes Fragment

MG900 bem4_M562A_fwd	ctctggagacgactcgaatcggtcgagctgttcagcggctcg
MH500 Bem4N600A_fwd	gcggaatgctagccctcggcgctttggcgcgcagcgatgcaca
MH502 Bem4R603A_fwd	tagccctcggcaattggcggccagcgatgcacactgtctaag
MG902 bem4_N600A_R603A_fw	gcggaatgctagccctcggcgctttggcggccagcgatgcaca
	ctgcttaag
MG904 bem4_N643A_fwd	ctcgtctcgcttctaaggctctgtcgatcccagccgcc
MG560 Bem4_Stop_NotI_rev	ctagcggcggccgctcaaacagtgccgatcttggtgacg

Zur Herstellung dieser Konstrukte wurde in einer ersten PCR das, für die jeweilige Mutante, linke und rechte Fragment amplifiziert. Diese Fragmente besitzen eine 34bp bzw. 52bp Homologieregion zu einander, in der sich auch die Mutation befindet. Beide Fragmente wurden zu gleichen Konzentrationen als Template für eine zweite PCR mit den Primer MG559 und MG560 benutzt. Das danach erhaltene Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI/NotI geschnitten und in die EcoRI/NotI Schnittstelle des pGEX4T-1 Vektors ligiert.

pGEX4T-1 Rac1^{Q61L}

Dieses Plasmid dient zur Herstellung von rekombinanten GST-Rac1^{Q61L}.

Herstellung:

MB506	cgtatgcctcgagaccgcagtatc
MB507	gggatactgcgggtctcgaggactacg

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde eine Quick Change PCR mit dem oben genannten Primer durchgeführt. Als Template diente das Plasmid pGEX4T-1 UmRac1.

pGEX4T-1 Ras1, pGEX4T-1 Ras2, pGEX4T-1 Rho1, pGEX4T-1 Rho2, pGEX4T-1 Rho3, pGEX4T-1 Rho4

Diese Plasmide dienen zur Expression von verschiedenen rekombinanten GST fusionierten GTPasen.

Herstellung:

MH392 Ras1_mscIindel_fwd	ctgatggccacccatatgtccaaagcacaattcttgcgagag
MH393 Ras1_notI_rev	gatcgcgccgcttagagaacgatacatttctggcagc
MG461 Ras2_NdeI_fw	tatcatatgagtggcaaatgatgatctacaagcttggtg

4. Material und Methoden

MH395 Ras2_notl_rev	gatcgcgccgctcaaaggatattgcatttgacttc
MH380 Rho1_SmaI NdeI_fwd	ctgacccggggcccatatgaacgggttacaacagtggctc
MH381 Rho1_notl_rev	gatcgcgccgctcacagcaaaacgcacttcttttggcg
MH378 Rho2_mscI NdeI_fwd	ctgatggccacccatattggcaccggcagcaattcgtagg
MH379 Rho2_notl_rev	gatcgcgccgcttagaggacgatacatttgcaagagcc
MH376 Rho3_mscI NdeI_fwd	ctgatggccacccatattgacgctgtgcggacttgtgc
MH377 Rho3_notl_rev	gatcgcgccgctcaggcgatggtgcaggcacgag
MG975 05734 EcoRI/NdeI fw	ctgagaattccatatgtctgaactccgccgaaagc
MH375 Rho4_notl_rev	gatcgcgccgcttagagaacggtgcaaccttcttcc

Die offenen Leserahmen der einzelnen GTPasen wurden mittels einer PCR auf c-DNA amplifiziert und das jeweilige erhaltende Fragment mit den Restriktionsenzymen NdeI/NotI geschnitten. Dieses wurde dann in den mit NdeI/NotI geöffneten pGEX4T-1 Gds1 Vektor ligiert.

4.2 Methoden

4.2.1 Mikrobiologische Methoden

Kultivierung von Mikroorganismen

Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* Stämmen (Kapitel 4.1.5) fand in einem autoklavierten dYT-Medium bei 37°C statt. Als Antibiotika wurde den Kulturen, die für die Anreicherung von Plasmid-DNA dienten, noch 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. *E. coli* Stämme für die Überexpression von rekombinanten Proteinen enthielten in ihrem Medium zusätzlich 25 µg/ml Chloramphenicol bzw. 20 µg/ml Gentamycin. Die Kultivierung dieser *E. coli* Kulturen erfolgte nach Induktion bei 20 °C einen Tag bzw. bei 16 °C für zwei Tage. Zur Herstellung von Langzeitkulturen wurden Übernachtskulturen von *E. coli* 1:1 mit dYT-Glycerin-Medium gemischt und bei -80 °C weggefroren.

dYT-Medium: 16 g/l Trypton
10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
in H₂O_{bid}
[Festmedium: 2 % (w/v) Agar]
121 °C 20 min autoklaviert

dYT-Glycerin-Medium: 16 g/l Trypton
10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
69,9 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid}
121 °C 20 min autoklaviert

4. Material und Methoden

dYT-Glycerin-Medium: 16 g/l Trypton
10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
69,9 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert

Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* (Kaptiel 4.1.5) fand bei 28 °C in YEPD Medium statt. Wurden Stämme auf Auxotrophiemarkern selektioniert, erfolgte die Anzucht in "Synthetic Complete"-Medium, dem die entsprechenden Aminosäuren fehlten. Zur Herstellung von Langzeitkulturen wurden Übernachtskulturen 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80 °C eingefroren.

YEPD-Flüssigmedium: 10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Bacto-Pepton
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert
2 % sterile Glukose (nachdem autoklavieren)
[Festmedium: 2% (w/v) Bacto-Agar]

Dropout-Mix: 2 g Alanin
2 g Arginin
2 g Asparaginsäure
2 g Asparagin
2 g Cystein
2 g Glutaminsäure
2 g Glutamin
2 g Glycin
2 g Inositol
2 g Isoleucin
2 g Lysin
1,5 g Methionin
0,2 g para-Aminobenzoesäure
2 g Phenylalanin
2 g Prolin
2 g Serin
2 g Theronin
2 g Tyrosin
2 g Valin

Synthetic Complete-Medium: 1,7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne (NH₄)₂SO₄
1,47 g/l Dropout-Mix (je nach Selektionsmarker wurde noch 0,2 g Histidin, 0,1 g Adenin, 0,2 g Tryptophan, 0,2 g Uracil, 0,2 g Leucin zugegeben)
in H₂O_{bid.}, pH5,6 (mit NaOH)
bei 121 °C 20 min autoklaviert
2 % sterile Glukose (nachdem autoklavieren)
[Festmedium: 2% (w/v) Bacto-Agar]

4. Material und Methoden

NSY-Glycerin-Medium:
(für *S. cerevisiae* und *U. maydis*) 8 g/l Nutrient Borth
1 g/l Hefeextrakt
5 g/l Saccharose
80 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert

Kultivierung von *U. maydis*

Die Anzucht von *U. maydis* Flüssigkulturen fand in der Regel in YEPS bzw. YEPSL Medium bei 28 °C statt. Stämme die den regulierbaren *crg*-Promotor besitzen, wurden für mikroskopische Untersuchungen auch in YEP- und YNB-Medium mit Arabinose bzw. Glukose angezogen. Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf PD-Agar oder Regenerationsagar, welche für die Selektion auch Hygromycin (200 µg/ml), Carboxin (2 µg/ml) oder Geneticin (400 µg/ml) enthielten. Um das filamentöse Wachstum zu untersuchen, dienten Tropftests der entsprechenden Kulturen auf PD Charcoal Platten oder auf CM Charcoal Platten. Zur Herstellung von Langzeitkulturen wurden Übernachtskulturen 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80 °C eingefroren.

YEPS-Flüssigmedium: 10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Pepton
20 g/l Saccharose
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert

YEPSL-Flüssigmedium: 10 g/l Hefeextrakt
4 g/l Pepton
4 g/l Saccharose
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert

YNB-Flüssigmedium: 1,7 g/l Yeast Nitrogen Base
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert
0,2 % Ammoniumsulfat (nachdem autoklavieren)
2 % Glukose oder Arabinose (nachdem autoklavieren)

YEP-Flüssigmedium: 10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Bacto-Pepton
in H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert
2 % Glukose oder Arabinose (nachdem autoklavieren)

PD-Agar: 24 g/l Potato Dextrose Broth
15 g/l Bacto-Agar
in 1:1 H₂O mit H₂O_{bid.} bei 121 °C 20 min autoklaviert

4. Material und Methoden

Regenerations-Agar:	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Bacto-Pepton 20 g/l Saccharose 182,2 g/l Sorbitol 13 g/l Bacto-Agar in $H_2O_{bid.}$ bei 121 °C 20 min autoklaviert
PD-Charcoal-Agar:	24 g/l Potato Dextrose Broth 10 g/l Activated Charcoal 15 g/l Bacto-Agar in $H_2O_{bid.}$ bei 121 °C 20 min autoklaviert
CM-Charcoal-Agar:	6 g/l NH_4NO_3 10 g/l Casamino Acids 1 g/l DNA 2 g/l Hefeextrakt 20 ml/l Vitamin-Lösung 250 ml/l Salz-Lösung 10 g/l Aktivkohle 20 g/l Bacto-Agar in $H_2O_{bid.}$ pH 7 bei 121 °C 20 min autoklaviert 2 % Glukose oder Arabinose (nachdem autoklavieren)
Salz-Lösung:	16 g/l KH_2PO_4 4 g/l Na_2SO_4 8 g/l KCl 4 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1,32 g/l $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 8 ml/l Spurenelement-Lösung in $H_2O_{bid.}$ und sterilfiltriert
Spurenelement-Lösung:	60 mg/l H_3BO_3 140 mg/l $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ 400 mg/l $ZnCl_2$ 40 mg/l $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$ 100 mg/l $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 40 mg/l $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ in $H_2O_{bid.}$ und sterilfiltriert
Vitamin-Lösung:	100 mg/l Thiamin 50 mg/l Riboflavin 50 mg/l Pyridoxin 200 mg/l Kalziumpantothenat 500 mg/l p-Aminobenzoessäure 200 mg/l Nikotinsäure 200 mg/l Cholinchlorid 1 g/l myo-Inositol in $H_2O_{bid.}$ und sterilfiltriert

Transformation von Mikroorganismen

Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Um chemisch kompetente *E. coli*-Zellen herzustellen, wurde die Kalzium-Mangan-Methode nach (Hanahan et al, 1991) verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in SOB-Medium ohne Magnesium bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 angezogen und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Die Kultur wurde dann bei 3200 rpm 15 min pelletiert und das Pellet in 1/3 Volumen eiskalten CCMB80-Puffer resuspendiert. Nach 20 min auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15 min, 3200rpm). Das Pellet wurde in 1/12 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Bacto Hefeextrakt
 0,5 g/l NaCl
 2,5 mM KCl

CCMB80-Puffer: 10 mM KOAc pH 7,0 (10 ml einer 1M Stammlösung /l)
 80 mM CaCl₂ * 2 H₂O (11,8 g/l)
 20 mM MnCl₂ * 4 H₂O (4,0 g/l)
 10 mM MgCl₂ * 6 H₂O (2,0 g/l)
 10 % Glycerin (100 ml/l)
 Auf pH 6,4 mit 0,1 M HCl einstellen

Transformation von *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 1 µl des Plasmids mit 50 µl chemokompetenten Zellen gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C erwärmt. Transformationen mit Plasmide die eine Amp^R besitzen wurden sofort auf dYT-Amp Platten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die Transformationsansätze mit pGBKT₇ Plasmiden, welche eine Kan^R besitzen, wurde erst noch mit 1 ml dYT-Medium versetzt und für 30-60 min unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min 3000 rpm), das Sediment in 100 µl steriles Wasser aufgenommen und auf dYT-Kann-Platten ausplattiert.

Herstellung und Transformation von kompetenten *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* wurde eine Vorkultur in YEPD bei 28 °C angezogen. Mit dieser Kultur wurde dann eine Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bei 28 °C auf eine OD₆₀₀ von 0,6 weiter angezogen. Anschließend wurden 50 ml der

4. Material und Methoden

Kultur bei 2000 rpm 3 min pelletiert und das Sediment dann in 25 ml H₂O gewaschen und erneut zentrifugiert (3 min 2000 rpm). Das entstandene Pellet wurde in 10 ml SORB-Puffer aufgenommen und noch einmal für 3 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Sediment in 360 µl SORB-Puffer resuspendiert und mit 60 µl Salmon Sperm DNA (vorher 5 min bei 95 °C aufgekocht) versetzt. Jeweils 50 µl Aliquots wurden bei -80 °C weggefroren oder direkt verwendet.

Zu den 50 µl kompetenten Zellen wurde 1 µg Plasmid-DNA und 300 µl PEG-Puffer dazugeben. Nachdem der Ansatz gut durchmischt war, erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min und anschließend ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Dann wurden die Zellen bei 2000 rpm 3 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl YEPD aufgenommen und auf den entsprechenden SC-Platten ausplattiert.

SORB-Puffer (pH 8): 100 mM Lithiumacetat
 10 mM TRIS
 1 mM EDTA
 1 M Sorbitol

PEG-Puffer (pH 8): 100 mM Lithiumacetat
 10 mM TRIS
 1 mM EDTA
 40 % (w/v) PEG3350 (1000)

Herstellung von *U. maydis* Protoplasten

Zur Herstellung von *U. maydis* Protoplasten wurden 50 ml YEPS-Flüssigkulturen der jeweiligen Stämme bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen und anschließend zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, RT). Das Zellsediment wurde in 10 ml SCS-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, RT). Dann wurde das Pellet in 2 ml SCS-Lysing-Enzym-Lösung aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Als der Anteil an Protoplasten im Ansatz ca. 70% betrug, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eiskalter SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2000 rpm, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit 10 ml eiskalter SCS-Lösung und einmal mit dem gleichen Volumen an eiskalter STC-Lösung gewaschen und in 500 µl eiskalte STC-Lösung aufgenommen. Die Protoplasten wurden in einem Volumen von 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

SCS-Lösung: 20 mM Natriumcitrat-Puffer pH5,8
 1 M Sorbitol

4. Material und Methoden

SCS-Lysing-Enzyme Lösung: 30 mg/ml Lysing Enzyme in SCS

STC-Lösung: 10 mM Tris/HCl pH7,5
 100 mM CaCl₂
 1 M Sorbitol

Transformation von *U. maydis* Protoplasten

Zur Transformation wurden 50 μ l *U. maydis* Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit 1 μ g der zu transformierenden DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l STC/PEG zugegeben und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel gemacht. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar ausplattiert. Dieser wurde in zwei Schichten übereinander gegossen, von denen die untere das Antibiotika in zweifacher Konzentration enthielt, für das die transformierte DNA die Resistenz vermittelt. Die obere Schicht war enthielt Ampicillin. So stellte sich durch Diffusion zwischen den beiden Schichten erst über einen längeren Zeitraum hinweg die übliche Konzentration des Antibiotikums ein, so dass es vorher zur Ausprägung der Resistenz in den transformierten Zellen und zu deren Regeneration kommen konnte. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert.

STC-PEG: 40 % (w/v) Polyethylenglycol in STC

Infektion von *Zea mays* mit *U. maydis*

Um die Pathogenität von *U. maydis*-Stämmen zu überprüfen, wurden die Stämme in YEPS Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen und dann zentrifugiert (5 min 3000 rpm). Die Pellets wurden in sterilen H₂O resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Kompatible Stämme wurden vorher noch 1:1 gemischt und anschließend wurde mit Hilfe einer Spritze 50 μ l der Kultur etwa 1 cm über der Erde in den Stängel, der 7 bis 8 Tage alten Maispflanzen, injiziert. Die Auswertung der Pflanzen fand 10 bis 11 Tage nach der Infektion statt. Die Pathogenitäts-symptome wurden in 6 Kategorien aufgeteilt.

Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

Um herauszufinden ob die hergestellten Deletionsmutanten (siehe Kaptiel) noch *maten* können, wurde ein Kreuzungstest durchgeführt. Dabei werden die Zellfusion und die anschließende Filamentbildung von kompatiblen Kreuzungspartnern mittels PD-Charcoal-

4. Material und Methoden

Platten untersucht. Bei der Kombination zweier kompatibler Kreuzungspartner, kann der Übergang zum filamentösen Wachstum in Form eines weißen Mycels beobachtet werden (Day & Anagnostakis, 1971). Nicht kompatible Kreuzungspartner wachsen weiter hefeartig und bilden Kolonien mit glatter Oberfläche aus. Zur Identifikation des Kreuzungsverhaltens der *U. maydis*-Stämme wurden die Stämme bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und die Kreuzungspartner im Verhältnis 1:1 gemischt. 5 µl der Mischung wurden dann auf den PD-Charcoal-Agar auf getropft. Als Kontrollen dienten Mischungen von nicht kompatiblen Wildtypstämmen. Nach zweitägiger Inkubation bei 20 °C ließ sich der Test auswerten.

Die Untersuchung der b-induzierten und rac1-induzierten Filamentbildung wurde mit den Stämmen SG200, AB31, Bub8 P_{crg}::*rac1* und dessen Derivate durchgeführt. Dabei wurden die in Kapitel 4.1.5 beschriebenen Stämme in YEPSL-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37 °C angezogen. SG200 und dessen Derivate wurde zentrifugiert (5 min 2000 rpm) und mit sterilen H₂O auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Von der eingestellten Kultur wurden dann 5 µl auf eine PD-Charcoal-Agar Platte getropft und bei 20 °C 12-24 h inkubiert. Die Stämme von AB31 und Bub8 P_{crg}::*rac1* wurden zweimal mit H₂O gewaschen und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 1 mit H₂O eingestellt. Es wurden jeweils 5 µl der Kulturen auf eine CM-Charcoal-Platte mit Glukose und eine CM-Charcoal-Platte mit Arabinose getropft und bei 20 °C für 12-24 h inkubiert. In dieser Arbeit wurde die Filamentbildung der einzelnen Stämme auch mikroskopisch untersucht.

Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen

Für die Mikroskopie wurden zuerst Vorkulturen in YEPSL-Medium bei 28 °C angezogen und von diesen dann die Hauptkulturen angeimpft. Die Hauptkulturen wurden meist über Nacht bei 28 °C in einem Schikanekolben angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 mikroskopiert. Die Stämme die einen regulierbaren Promotor besitzen, wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen und dann zweimal mit YNB bzw. YEP gewaschen und anschließend in YNB oder YEP mit Arabinose bzw. Glukose aufgenommen. Die Induktion erfolgte dann für 4 bis 12 h bei 28 °C. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops des Typs Axioskop 2 (Zeiss) und der Volocity Software wurden die *U. maydis* Zellen dann mikroskopiert. Für die Mikroskopie wurden 5 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken 1,5 % Wasseragarschicht bedeckten Objektträger auf getropft und darüber dann das Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente zur Fixierung der Zellen an ihrer Position, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der verschiedenen Farbstoffe wurden die zur

4. Material und Methoden

Wellenlänge passenden Filter genutzt. Vergleichsfotos wurden im Phasenkontrast und im Differentialkontrast gemacht und mit einer Kamera der FA Zeiss (Typ Mega Fire) dokumentiert. Die Bilder wurden mit dem Programm ImageJ bearbeitet.

Die Färbung von Kompartimenten und Zellwänden erfolgte mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Vakuolen wurden mit CellTrackerTMblue (CMAC) gefärbt, welcher im saurem Bereich fluoresziert (Stewart & Deacon, 1995). Für die Visualisierung der Septen und der Zellwandfärbung wurde der Farbstoff Calcofluor verwendet, welchen neu gebildetes Zellwandmaterial färbt. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 1 µl CMAC bzw. Calcofluor zu 100 µl Zellkultur, 10 min Inkubation und anschließend wurde mit H₂O gewaschen. Danach fand die Betrachtung der Zellen mit dem DAPI-Filter statt.

Name	Zellbestandteil	µg/ml Kultur	Excitation	Emission	Farbe
GFP	Fusionsproteine	-	475 nm	509 nm	grün
Calcofluor	Glucan	2	350 nm	461 nm	blau
CMAC	Vakuolen	1	350 nm	466 nm	blau

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von DNA

Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten Variante der „Alkalischen Lyse“ (Birnboim & Doly, 1979). Aus einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 3 ml zentrifugiert (1 min 13000rpm) und das Pellet dann in 100 µl Lösung A aufgenommen. Anschließend wurden zu dem Ansatz 200 µl der Lösung B geben und alles gut durchmischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 150 µl Lösung C. Hinterher wurde das Gemisch zweimal für jeweils 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 400 µl 96 % Isopropanol fand die DNA-Fällung statt. Nach einem 15 min Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen und erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 65 °C für 3 min getrocknet und anschließend in 75 µl TE mit RNase A aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde anhand des Vergleiches mit einem Mengenstandard (*Lambda*-DNA in aufsteigenden, definierten Konzentrationen) im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt. Die

4. Material und Methoden

Bestimmung der DNA-Konzentration der Hefe-zwei-Hybrid Plasmide erfolgte mittels Nano-Drop.

Lösung A: 50 mM Glukose
25 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM Na₂-EDTA
100 µg/ml RNaseA

Lösung B: 200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

Lösung C: 3 M Kaliumacetat pH 4,8

TE-RNase A: 10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM Na₂-EDTA
50 µg/ml RNaseA

Um besonders reine Plasmid-DNA zu erhalten, wurde der ZR Plasmid MiniprepTM-Classic der Firma ZYMO Research gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

Präparation von Plasmid DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *S. cerevisiae* fand mit Hilfe des ZR Plasmid MiniprepTM-Classic (ZYMO Research) statt. Dafür wurden 1,5 ml Zellen geerntet und das Pellet in 200 µl Puffer 1 des ZR Plasmid MiniprepTM-Classic (ZYMO Research) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µg Glasperlen wurde das Gemisch für 15 Minuten auf dem Vibrax (V_{\max}) geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Puffers 2 und danach geschah die weitere Plasmidisolation gemäß dem Herstellerprotokoll.

Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis*

Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus *U. maydis* wurden 2 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (1 min 13000rpm) und das Pellet anschließend in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Dazu wurden noch 500 µl Phenol/Chloroform und 300 mg Glasperlen gegeben und der ganze Ansatz für 15 min auf dem Vibrax (V_{\max}) schütteln gelassen. Nach einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm wurde die klare obere Phase in eine neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl 96 % Isopropanol fand die DNA-Fällung statt, der ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min 13000 rpm) folgte. Das dadurch entstandene DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen und anschließend noch mal zentrifugiert (5 min 13000 rpm). Nachdem vollständigen trocknen des Pellets, wurde dieses in 50 µl TE-RNase A aufgenommen.

4. Material und Methoden

Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0	Phenol/Chloroform:	50 % (v/v)Phenol
	100 mM NaCl		50 % (v/v)Chloroform
	1 mM EDTA		
	1 % (w/v) SDS		
	2 % (w/v) Triton X-100		

Modifikation von DNA

Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Zum Schneiden der DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden Enzyme und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Thermo Scientific (Fermentas) verwendet. Sowohl die Pufferkonzentration, als auch die Inkubationstemperatur und Enzymkonzentration wurde nach Herstellerangaben gewählt. Bei Ansätzen mit zwei Enzymen wurde auf die Puffer-Kombinationstabellen der Hersteller zurückgegriffen.

Dephosphorylierung von DNA

Um die Selbstligation von Vektoren zu minimieren, wurden die geschnittenen Vektoren mit der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) der Firma Thermo Sciens (Fermentas), in entsprechendem, vom Hersteller mitgelieferten Puffer, dephosphoryliert. Das Enzym wurde den Ansätzen im Volumen von 0,5-1 μ l zugegeben und nach der einstündigen Inkubation bei 37°C durch Hitze inaktiviert (15 min, 65°C). Die Dephosphorylierung der DNA wurde auch mit der Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) der Firma NEB nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach ca. 15 min inkubieren bei 37 °C wurde die behandelte Probe auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von zwei bis drei DNA-Fragmenten, wurden diese in geeignetem Verhältnis (i.d.R. 1/10 Vektor und 9/10 zu inserierendes Fragment) in einem Reaktionsgefäß auf ein Endvolumen von 17 μ l vereinigt und mit 2 μ l 10xLigasepuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase (1U/ μ l) der Firma Roche versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-Reaktion (Bell, 1989; Mullis et al, 1986; White et al, 1989) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Durch eine thermostabile Polymerase werden mit Hilfe von Primern

4. Material und Methoden

und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Die PCR-Reaktion läuft in 4 charakteristischen Schritten ab. Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei dem die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95 °C in einzelsträngige DNA überführt. Das Annealing findet bei einer Temperatur zwischen 50 °C bis 70 °C statt, hier binden die PCR-Primer an die DNA-Einzelstränge. Der dritte Schritt ist die Elongation, bei der die (Phusion) Polymerase bei 72 °C ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Durch eine erneute Denaturierung bei 95 °C beginnt der Zyklus erneut.

Reaktionsansatz:	10 µl 5x GC-Puffer	Zyklus:	2,3 min	95 °C	
	1 µl dNTPs (10 mM)		10 sec	95 °C	
	0,5 µl 5'Primer (25 mM)		10 sec	55-70 °C	} 30x
	0,5 µl 3'Primer (25 mM)		20 sec	72 °C	
	100 ng Matrizen-DNA		(20 sec pro 1 kb)		
	1,5 µl DMSO		5 min	72 °C	
	1 µl Phusion Polymerase				
	H ₂ O ad 50 µl				

Analyse von DNA

Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Agarosegele benutzt (Sharp et al, 1973). Eine Suspension von 1,2 % Agarose wurde in TAE-Puffer aufgeköcht. Nach dem Herunterkühlen auf 60 °C wurde das Gel mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm eingegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte, horizontale Gelkammer eingelegt. Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurde mit 1/10 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Taschen gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 90-130 V. Als Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix der Firma Thermo Scientific verwendet. Zur Dokumentation wurden die DNA-Banden durch UV-Licht (304nm) sichtbar gemacht und mittels des Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad) fotografiert und mit der Software Image Lab ausgewertet.

TAE-Puffer:	40 mM Tris/HCl pH8,3
	20 mM Natriumacetat
	2 mM EDTA

10x DNA-Auftragspuffer:	0,2 % (w/v) Orange G
	50 % (w/v) Saccharose
	1 mM EDTA

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation spezifischer DNA-Fragmente aus den Gelen, wurden entsprechende Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Gel/PCR Fragment Extraktions Kit der Firma Avegene den Herstellerangaben entsprechend extrahiert.

Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten definierter Größe und Sequenz wurde die Southern Blotting Methode (Southern, 1992) durchgeführt. Dabei wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert. Das Gel wurde erst für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und danach für 20 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Zur Übertragung der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia) wurde auf eine dicke Schicht saugfähiges Papier drei Schichten in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier gelegt und darüber die Nylonmembran. Auf die Nylonmembran wurde dann das Agarose-Gel gelegt und darüber noch mal 2 getränkte Blotting-Papier. Ein drittes Blotting-Papier was quer über den Blot lag wurde in ein Gefäß mit 0,4 M NaOH gelegt. Auf den Blot oben drauf wurde noch eine Glaspatte mit einer Flasche gestellt. Das Gel wurde entweder für mind. 3 h über Tag oder über Nacht geblottet. Die Membran wurde nach dem Blotten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) im Stratalinker 2400 (Stratagene) darauf fixiert. Anschließend wurde die Membran 20 min bei 60°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert.

Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Church & Gilbert, 1984). Zur Herstellung der radioaktiven Sonden wurde das Megaprime Labeling System Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet. Dabei wurden 25 ng Sonden-DNA mit einer Länge von 400-1000 bp mit 5 µl der Primer-Lösung (Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz) und destilliertem Wasser auf ein Volumen von 33 µl aufgefüllt und im Heizblock bei 95 °C 5 min denaturiert. Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt und 10 µl Reaktionspuffer (Puffersubstanzen und alle dNTPs außer dCTP), 2 µl Klenow Polymerase und 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 3 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die Sonde wurde mit Hilfe einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation von überschüssigen Nukleotiden

4. Material und Methoden

gereinigt. Anschließend wurde sie bei 95 °C 5 min denaturiert und zu der Nylonmembran hinzugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 60 °C inkubiert und die Membran anschließend in 2x 15 ml Southern- Waschpuffer 20 min gewaschen. Danach wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und einen Tage in einer Phosphorimager Kassette (Amersham) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm860, Amersham).

Depurinierungs-Lösung: 0,25 M HCL Transferpuffer: 0,4 M NaOH

Hybridisierungspuffer: 7 % (w/v) SDS
500 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

Southern-Waschpuffer: 1 % (w/v) SDS
100 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

Genetische Modifikation von *U. maydis*

Herstellung von Deletionsmutanten in *U. maydis*

Die Herstellung einer Deletionsmutante in *U. maydis* erfolgte mit Hilfe der homologen Rekombination, indem der offene Leserahmen durch eine Antibiotika-Resistenz-Kassette ausgetauscht wird. Um eine gute homologe Rekombination in *U. maydis* durchführen zu können, benötigt man eine ca. 1000 bp Homologieregion. Das Deletionskonstrukt besaß daher eine ca. 1000 bp Homologieregion vor dem offenen Leserahmen und eine 1000 bp homologe Region hinter dem Gen. Diese Flanken wurden mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe der homologen Rekombination in *S. cerevisiae* wurden die Flanken mit einem Vektor und der Resistenzkassette generiert (*Drag and Drop*).

Die *Drag and Drop* Methode (Colot et al, 2006) macht sich die Eigenschaft zu nutzen, dass *S. cerevisiae* ein sehr hohes effizientes Rekombinationsystem besitzt und schon bei ca. 29 bp homologe Rekombination stattfindet. Um diese Methode für die Generierung von z. B. Deletionskonstrukten für *U. maydis* zu benutzen, wurden die Flanken mittels Primer mit einer ca. 29 bp Homologieregion jeweils zu dem Vektor pRS426 und zu dem der Antibiotika-Resistenzkassette versehen. Die linke Flanke enthielt am 5' Ende neben der 29 bp Homologieregion zu pRS426 auch noch eine SspI Schnittstelle und am 3' Ende neben der 29 bp Homologieregion zur Resistenzkassette eine SfiI Schnittstelle, bei der rechten Flanke war es genau umgekehrt. Dies ermöglichte zum einen das Ausschneiden des

4. Material und Methoden

Deletionskonstruktes und zum anderen das Auswechseln von Antibiotika-Resistenzkassetten. Die Antibiotika Resistenzkassetten sind speziell zum Gebrauch in *U. maydis* konzipiert wurden (Brachmann et al, 2004). Diese wurde vor dem Transformieren in *S. cerevisiae* noch mit SfiI geschnitten. Der Vektor pRS426 wurde mit den Enzymen KpnI und BamHI geöffnet. Ungefähr 200 ng pRS426, 500 ng der Flanken und 500 ng der Resistenzkassette wurden für die Transformation mit *S. cerevisiae* eingesetzt. Durch homologe Rekombination der ca. 29 bp Homologieregionen zwischen den Flanken mit der Resistenzkassette und dem pRS426 Vektor wurde dann das Konstrukt generiert. Nach der Amplifikation des Deletionskonstruktes in *E. coli* wurde es mit SspI herausgeschnitten und in *U. maydis* transformiert.

Herstellung von konditionalen Mutanten in *U. maydis*

Die Herstellung einer konditionalen *U. maydis* Mutante am endogenen Ort erfolgte genauso wie die Deletionsmutante mittels homologer Rekombination. Anstatt nur einer Antibiotika-Resistenzkassette, besitzt die Kassette, zur Herstellung von konditionalen Mutanten, noch den P_{crp} Promotor nach der Antibiotika-Resistenz. Die linke Flanke bestand wie die für eine Deletion, aus ca. 1000 bp vor dem offenen Leserahmen, die rechte Flanke enthielt jedoch die ersten 1000 bp des offenen Leserahmens. Generiert wurde das Konstrukt wieder mittels *Drag and Drop* in *S. cerevisiae*. Bevor es in *U. maydis* transformiert wurde, wurde es mit SspI geschnitten.

Herstellung von C-terminalen Fusionen am endogenen Locus in *U. maydis*

Auch bei der Herstellung einer C-terminalen Fusion am endogenen Locus, wurden die GFP bzw. 3xHA Fusion mittels homologer Rekombination eingefügt. Die durch PCR amplifizierten Flanken wiesen hierbei eine ca. 1000 bp Homologie zum 3' Ende des offenen Leserahmens auf (linke Flanke) und die rechte Flanke war identisch zur rechten Flanke des Deletionskonstruktes. Der *reverse* der linken Flanke wurde so konzipiert, dass das Stopp-Codon deletiert wurde. Das Konstrukt wurde mit Hilfe von *Drag and Drop* in *S. cerevisiae* generiert und mit SspI geschnitten, bevor es in *U. maydis* transformiert wurde.

Integration von Plasmiden in den *ip*-Lokus von *U. maydis*

Der *ip*-Lokus von *U. maydis* kodiert für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase. Ein Aminosäureaustausch an Position 257 von Histidin nach Leucin führt dazu, dass der Organismus eine Resistenz gegen das Fungizid Carboxin entwickelt

4. Material und Methoden

(Broomfield & Hargreaves, 1992). Für die Integration von Genen in den *ip*-Lokus wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ip^R*) tragen. Diese Plasmide (siehe Kapitel 4.1.6) wurden über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven, *ip*-Allel (*ip^S*) in das Genom von *U. maydis* eingebracht.

4.2.3 Biochemische Methoden

Anreicherung und Isolierung von Proteinen

Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die in (Absatz) beschriebenen pGEX4T-1 Derivate in die *E. coli* Stämme Arctic Express (DE3) bzw. BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Codon 3+) transformiert. Aus einer Vorkultur wurde eine Hauptkultur im Verhältnis 1:100 an geimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,6 angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von 0,1-0,2 mM IPTG. Arctic Express (DE3) wurde bei 16 °C für zwei Tage weiter inkubiert und BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Codon 3+) bei 20 °C über Nacht. Die Kultur wurde anschließend durch Zentrifugation (20 min 4000rpm) pelletiert und die Zellen aufgeschlossen oder bei -80 °C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem Lysispuffer aufgenommen und durch 4-fache French-Press-Passage mechanisch aufgeschlossen. Anschließend fand ein Zentrifugationsschritt in einer Ultrazentrifuge statt (1h, 35000 rpm, 4°C), durch den vom Rohlysat unlösliche Bestandteile abgetrennt wurden. Der klare Überstand wurde durch einen 0,45 µm Sterilfilter weiter gereinigt.

Lysispuffer:	50 mM Tris pH 7,5
	100 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mg/ml Lysozym
	5 mM DTT
	Complete Proteaseinhibitor ohne EDTA (Roche)

Die weitere Aufreinigung fand in dieser Arbeit durch zwei unterschiedliche Methoden statt. In der einen Methode wurden der klare Überstand für eine Stunde rollend mit 300 µl Glutathion Sepharose Beads (GE Healthcare) inkubiert. Die Beads wurden dann abzentrifugiert (2 min 700 g) und 5-mal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Beads in ein Eppendorf- Gefäß überführt und mit Elutionspuffer eluiert.

In der zweiten Methode wurden die rekombinanten Proteine mit Hilfe einer FPLC (Äkta-Pure Systems der Firma GE Healthcare) aufgereinigt. Die dafür benutzte Säule bestand aus

4. Material und Methoden

einem 10 ml GSH-Agarose Matrix, welche zu vor mit 10 CV Waschpuffer gewaschen wurde. Anschließend wurde das Rohextrakt mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule gegeben und diese danach wieder mit 10 CV Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte stufenweise. Als erstes wurden 15 % Elutionspuffer dazugeben. In einem zweiten Schritt wurde die Konzentration auf 30 % Elutionspuffer gesteigert und im letzten Schritt dann 100 %. Die Säule wurde zur Regenerierung jeweils 2 Runden zuerst mit 10 CV Regenerationspuffer 1 und danach mit 10 CV Regenerationspuffer 2 gewaschen. Die Überprüfung der Reinheit der eluierten Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE.

Waschpuffer:	50 mM Tris pH 7,5 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 5 mM DTT
Elutionspuffer:	50 mM Tris pH 8 150 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 15 mM reduziertes Glutathion 5 mM DTT
Regenerationspuffer 1:	100 mM Tris-HCL pH 8,5 0,5 mM NaCl
Regenerationspuffer 2:	100 mM NaOAc pH 4,5 0,5 mM NaCl

Die eluierten Proteine wurden über Nacht in Dialysepuffer dialysiert und anschließend mittels Vivaspin 20 MWCO 30000 auf unterschiedliche Endkonzentration (Gds1 und Derivate 90 µM; GTPasen 50 µM; Cdc42^{Q61L/T17N}, Rac1^{Q61L/T17N} und GST 100 µM) an konzentriert und dann in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert.

Dialysepuffer:	20 mM Tris pH 8.0 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM Glycerin 5 mM DTT
----------------	--

Proteinextraktion aus *U. maydis*

Diese Methode wurde benutzt, um ein Proteinextrakt aus *U. maydis* zu gewinnen, welches anschließend in einem Pulldown-Assay eingesetzt wurde. Zur Herstellung von

Analyse von Proteinen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteinextrakte wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese genutzt. Bei dieser Methode werden durch binden von SDS an die Proteine eine negative Ladung hergestellt, welches die Auftrennung der Proteine in einem elektrischen Feld ermöglicht. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel, welches für das Anhäufen der Proteine in einer Ebene dient und einem Trenngel, das aus einem Polyacrylamidnetz besteht, indem die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden in der Regel 10 % bzw. 12 % konzentrierte Polyacrylamidgele benutzt. Das Trenngel, das für den Nachweis, der in der Hefe-zwei-Hybrid-Analyse zu testeten Proteine, benutzt wurde, bestand aus zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Die untere Hälfte war ein 12 % Polyacrylamidgel und die obere Hälfte ein 8 % iges. Die Zusammensetzung ist in Tab. 2 gezeigt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Komponenten für Sammelgel und verschieden konzentrierten Trenngelen

Komponenten	%	1 M Tris pH 8,8	1 M Tris pH 6,8	10% SDS	Aa/Bis 30:0,8	H ₂ O	10 % APS	TEMED
Trenngel	8	2,25 ml	-	75 µl	1,6 ml	2 ml	100 µl	10 µl
Trenngel	10	2,25 ml	-	75 µl	2 ml	1,6 ml	100 µl	10 µl
Trenngel	12	2,25 ml	-	75 µl	2,4 ml	1,2 ml	100 µl	10 µl
Sammelgel	-	-	375 µl	30 µl	500 µl	2,05 ml	50 µl	7,5 µl

Für die Proteingele wurden Mini-Protean 2 Apparaturen (Biorad) verwendet. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt und mit Wasser auf ihre Dichtheit hin überprüft. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels, wurde der Alkohol vollständig abgenommen, das Sammelgel eingegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels, wurde der Kamm entfernt, die Taschen sorgfältig gespült und das Gel in die vertikale Laufkammer eingesetzt. Die äußere und die innere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden je nach Präparationsmethode mit 5x Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden 5 min zur

4. Material und Methoden

Denaturierung aufgekocht, kurz an zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zuerst bei 120 V bis die Proben ins das Trenngel gelaufen waren, danach wurde Spannung auf 150 V erhöht. Als Längenstandard wurde der Marker „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ der Firma Thermo Scientific (Fermentas) verwendet.

Laufpuffer: 25 mM Tris/ HCl pH8,8
200 mM Glycin
0,1 % SDS

5x Proteinauftragspuffer: 250 mM Tris-HCL pH 6,8
5% (v/v) β - Mercaptoethanol
0,02 % (w/v) Bromphenolblau
30 % (v/v) Glycerin
20 % (w/v) SDS

APS Stammlösung: 10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat

SDS Stammlösung: 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

Um die Gesamtheit der Proteinbanden auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel in eine Coomassie-Brilliantblue Färbelösung gelegt und kurz in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Gel so lange in Entfärber-Lösung gelegt bis die Banden zu erkennen waren. Um diesen Prozess zu beschleunigen, konnte man das Gel in der Entfärberlösung auch kurz aufkochen. Anschließend wurde mit Hilfe des Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad) dokumentiert.

Proteingel-Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
20 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber-Lösung: 20 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Transfer und Nachweis von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blot)

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Mini Trans-Blot® Zelle (BioRad) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dabei wurde auf die schwarze

4. Material und Methoden

Unterseite der Kassette zuerst ein in Transferpuffer getränktes Schwämmchen gelegt, gefolgt von einem getränkten Whatmann-Papier, darauf das Gel, dem die Nitrocellulose-Membran folgte mit einem weiteren Whatmann-Papier und Schwämmchen. Anschließend wurde die weiße Oberseite der Kassette darüber gelegt und die Kassette dann verschlossen. Dies wurde in den Mini Trans-Blot Central Core gesteckt, der sich bereits in dem mit 1x Transferpuffer gefüllten Tank befand. Der Transfer fand über Nacht bei 25 V bzw. auch über Tag bei 100 V für 1-2 h bei 4 °C statt. Um den erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 min in eine Ponceau-S-Lösung gelegt und anschließend durch mehrmaliges waschen mit Wasser entfärbt, bis die Gesamtheit der Proteinbanden deutlich sichtbar war. Nachdem fotografieren wurde die restliche Ponceau-S-Lösung mit TBST_{0,1}-Milch abgewaschen.

Nach 20 min Inkubation der Membran in TBST_{0,1}-Milch wurde sie in 10 ml TBST_{0,1}-Milch mit einer 1:1000 Verdünnung des primären Antikörper (GFP mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology; mouse monoclonal IgG, eigene Herstellung; 1:5000 Verdünnung Myc mouse monoclonal IgG, Cell signaling Tech. Inc.)gelegt und über Nacht bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Dann wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST_{0,1} gewaschen und anschließend mit einer 1:10000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (donkey anti-mouse IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology) in TBST_{0,1}- Milch eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Antikörper-markierten Proteine wurden nach der ECL Methode detektiert (Tessier et al, 1994). Dabei wurde die Membran für 1 min mit 10 ml ECL-Lösung I und II inkubiert. Die Auswertung der Chemilumineszenz fand mit Hilfe der „Chemostar Professional Apparatur“ unter Verwendung der „ChemoStar Imager Software“ statt.

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
PonceauS-Färbelösung:	0,1 % (w/v) Ponceau S 5 % (v/v) Essigsäure
TBST _{0,1} :	0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS
TBST _{0,1} Milch:	TBST _{0,1} mit 4 % (w/v) Trockenmilch

4. Material und Methoden

ECL-Lösung I: 100 mM Tris/HCl pH 8,5
 2,5 mM Luminol
 400 µM p-Cumarsäure

ECL-Lösung II: 100 mM Tris/HCl pH 8,5
 5,4 mM H₂O₂

Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

GST pulldown assay

GST pulldown Analysen werden durchgeführt, um Protein-Protein-Interaktion *in vivo* zu testen. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Untersuchung möglicher Gds1 Interaktionspartner benutzt. Desweiteren diente sie auch zur Überprüfung der Interaktion von Sec3 mit aktiven bzw. inaktiven GTPasen. Für den Pulldown wurden 5 nM GST-Gds1 bzw. 6 nM GST zu 600 µl 1:1 Gemisch von GSH-Agarose mit Waschpuffer geben und bei 4 °C 1 h inkubiert. Bei den Pulldown-Analysen von Sec3 mit Cdc42 bzw. Rac1 und deren Derivate wurden ca. 4 nM GTPase bzw. GST mit 400 µl 1:1 GSH-Agarose mit Waschpuffer gemischt und bei 4 °C 1 h inkubiert. Zusätzlich wurden die Ansätzen von GST-Cdc42^{Q61L} bzw. GST-Rac1^{Q61L} noch mit 10 mM EDTA und 1mM GTPγS versetzt, bei GST-Cdc42^{T17N} bzw. GST-Rac1^{T17N} wurde den Ansätzen anstatt GTPγS 10mM GDP dazugeben. Gestoppt wurde diese Reaktion durch Zugabe von 25 mM Magnesium, welches zur Stabilität des Nukleotids in der GTPase diente.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze 3x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und jeweils 100 µl des 1:1 Gemisches (beladene Beads mit Waschpuffer) wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Diesen Ansätzen wurden dann mit 500-900 µg Proteinextrakt aus *U. maydis* gemischt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 7x mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die beladenen Beads dann in 2x Proteinauftragspuffer aufgenommen. Nachdem aufkochen bei 95 °C für 5 min konnten die Proben bei -80 °C weggefroren werden oder wurden zur Auftrennung auf ein SDS-PAGE geladen.

Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

Diese Methode dient der Untersuchung auf direkte Proteininteraktion *in vivo*. Dabei werden die Aktivierungsdomäne und Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 voneinander getrennt und an die zu testenden Proteine fusioniert. Findet eine Interaktion zwischen den Proteinen statt, sind die Aktivierungs- und Bindedomäne wieder so nahe zusammen, dass

die Funktion des Gal4 Transkriptionsfaktors wieder hergestellt ist und ein bestimmtes Reportergen exprimiert werden kann, welches durch Gal4 reguliert wird. In dieser Arbeit wurde das Hefe-zwei-Hybrid-System der Firma Clontech benutzt. Dafür wurden die im Kaptiel 4.1.6 beschriebenen Plasmid, pGADT₇ bzw. pGBKT₇ und Derivate, in den Hefe-Stamm AH109 kotransformiert und auf SC-Leu-Trp selektioniert. Um die korrekte Expression der Proteine zu untersuchen, wurden Proteinextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Western Blot (Kaptiel) verifiziert. Der Stamm AH109 besitzt die UAS Sequenz von Gal4 vor drei verschiedenen Reportergenen: HIS3, ADE2 und MEL1 (oder lacZ). Die hergestellten Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 in SC-Leu-Trp bei 28 °C angezogen und dann mit H₂O_{dest.} auf eine OD₆₀₀ von 1 gebracht. Diese Kulturen wurden dann 1:10 mit H₂O_{dest.} verdünnt, gut durchmischt und davon wurden 6 µl auf SC-Leu-Trp-Ade-His Platten getropft und auf die Kontrollplatten mit SC-Leu-Trp. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert und anschließend fotografiert.

GEF-Assay *In vitro* Untersuchung von Guanin-Nukleodit-Austauschfaktoren

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Fluoreszenz-basiertes Testsystem (Neal et al, 1990). In dieser Arbeit wurde es angewendet, um *in vitro* zu untersuchen, ob es sich bei Gds1 um einen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor handelt und von welcher GTPasen Gds1 den Austausch GDP zu GTP katalysieren kann. Die Fähigkeit des GEFs den Austausch von GDP zu GTP zu katalysieren wird in einem GEF-Assay mit Hilfe des Nukleotid-Analogs 2'(3')-O-(N-Methylantraniloyl)-GDP (mantGDP) analysiert. Das Nukleotid-Analog hat in wässriger Lösung eine relativ geringe Fluoreszenz. Sobald es an eine GTPase gebunden hat, steigt die Fluoreszenz jedoch stark an und dieser Anstieg der Fluoreszenz wird in einem GEF-Assay gemessen. Hierbei wird die GTPase in Anwesenheit eines GEFs und einem Überschuss an mantGDP inkubiert. Ist der GEF in der Lage, den Nukleotid-Austausch an der entsprechenden GTPase zu katalysieren, wird das gebundene Nukleotid bevorzugt durch das im Überschuss vorhandene mantGDP ersetzt. Desweiteren wurde noch mal parallel zwei Kontrollreaktion durchgeführte, die Eine ohne GEF dafür aber mit 16 mM EDTA und die Andere nur mit GEF-Puffer und GTPase. Die Reaktion mit EDTA dient zur Untersuchung der GTPase-Aktivität, die zweite Reaktion erlaubt eine Bestimmung des spontanen Nukleotid-Austauschs. Die *in vitro*-Untersuchungen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit Hilfe des Synergy Mx Multi-Detektions-Reader (BioTek®) bei 25°C durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen GTPasen in GEF-Assay-Puffer, der 400 nM mantGDP enthielt, auf eine Endkonzentration von 1 µM bzw. bei den Ras-GTPasen 2 µM verdünnt. Aus diesem

4. Material und Methoden

Ansatz wurden je 300 μ l für die Mess- und die Kontrollreaktionen in eine schwarze 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gegeben. Diese Reaktionsansätze wurden zunächst für 5 min inkubiert, hierbei wurde schon die Fluoreszenz in Abständen von 1 min gemessen. Anschließend wurde gereinigter GEF in einer Endkonzentration von 3 μ M (wenn nicht anders erwähnt) zugegeben und die Reaktionskinetik für 30-60 min gemessen. Die gewonnenen Daten wurden gegen die Initiale-Fluoreszenz normalisiert und mit Hilfe des Programms Microsoft Excel graphisch dargestellt.

GEF-Assay-Puffer:	20 mM Tris pH 8.0
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM Glycerin
	1 mM DTT
	50 μ g/ml BSA
	400 nM mantGDP

5. Literaturverzeichnis

Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA (1992a) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267: 20033-20038

Adamson P, Paterson HF, Hall A (1992b) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* 119: 617-627

Baek K, Knodler A, Lee SH, Zhang X, Orlando K, Zhang J, Foskett TJ, Guo W, Dominguez R (2010) Structure-function study of the N-terminal domain of exocyst subunit Sec3. *J Biol Chem* 285: 10424-10433

Banuett F, Herskowitz I (1989) Different a alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5878-5882

Banuett F, Herskowitz I (1994) Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Exp Mycology* 18

Banuett F, Herskowitz I (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122: 2965-2976

Banuett F, Herskowitz I (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 37: 149-170

Bauer A (2011) Die Rolle von Ras1 bei der Regulation des polaren Wachstums in *Ustilago maydis*. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Baumann S, Pohlmann T, Jungbluth M, Brachmann A, Feldbrügge M (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* 125: 2740-2752

Becht P, König J, Feldbrügge M (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* 119: 4964-4973

Bell J (1989) The polymerase chain reaction. *Immunol Today* 10: 351-355

Bendezu FO, Vincenzetti V, Martin SG (2012) Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles. *PLoS One* 7: e40248

Berg TJ, Gastonguay AJ, Lorimer EL, Kuhnmuench JR, Li R, Fields AP, Williams CL (2010) Splice variants of SmgGDS control small GTPase prenylation and membrane localization. *J Biol Chem* 285: 35255-35266

Bergo MO, Leung GK, Ambroziak P, Otto JC, Casey PJ, Young SG (2000) Targeted inactivation of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells. *J Biol Chem* 275: 17605-17610

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523

Bodemann BO, Orvedahl A, Cheng T, Ram RR, Ou YH, Formstecher E, Maiti M, Hazelett CC, Wauson EM, Balakireva M, Camonis JH, Yeaman C, Levine B, White MA (2011) RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell* 144: 253-267

Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654

Bölker M, Urban M, Kahmann R (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68: 441-450

Bourne HR (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9: 134-142

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-132

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127

Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P (2004) Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol* 167: 889-901

Brachmann A, König J, Julius C, Feldbrugge M (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 272: 216-226

Brachmann A, Schirawski J, Muller P, Kahmann R (2003) An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J* 22: 2199-2210

Brachmann A, Weinzierl G, Kamper J, Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 42: 1047-1063

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* 47: 423-445

Brennwald P, Kearns B, Champion K, Keranen S, Bankaitis V, Novick P (1994) Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* 79: 245-258

Broek D, Toda T, Michaeli T, Levin L, Birchmeier C, Zoller M, Powers S, Wigler M (1987) The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48: 789-799

Broomfield PL, Hargreaves JA (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 22: 117-121

Cales C, Hancock JF, Marshall CJ, Hall A (1988) The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature* 332: 548-551

Casey PJ, Thissen JA, Moomaw JF (1991) Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8631-8635

Christensen JJ (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Monograph No 2* American Phytopathological Society

Chuang TH, Xu X, Quilliam LA, Bokoch GM (1994) SmgGDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the Rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem J* 303 (Pt 3): 761-767

Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1991-1995

Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10352-10357

Cote JF, Vuori K (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* 115: 4901-4913

Couve A, Gerst JE (1994) Yeast Snc proteins complex with Sec9. Functional interactions between putative SNARE proteins. *J Biol Chem* 269: 23391-23394

Croteau NJ, Furgason ML, Devos D, Munson M (2009) Conservation of helical bundle structure between the exocyst subunits. *PLoS One* 4: e4443

Cullen PJ, Sabbagh W, Jr., Graham E, Irick MM, van Olden EK, Neal C, Delrow J, Bardwell L, Sprague GF, Jr. (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* 18: 1695-1708

Cullen PJ, Schultz J, Horecka J, Stevenson BJ, Jigami Y, Sprague GF, Jr. (2000) Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* 155: 1005-1018

Cullen PJ, Sprague GF, Jr. (2012) The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190: 23-49

Cuthbertson BJ, Liao Y, Birnbaumer L, Blackshear PJ (2008) Characterization of zfs1 as an mRNA-binding and -destabilizing protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 283: 2586-2594

Das A, Guo W (2011) Rabs and the exocyst in ciliogenesis, tubulogenesis and beyond. *Trends Cell Biol* 21: 383-386

Day PR, Anagnostakis SL (1971) Corn smut dikaryon in culture. *Nat New Biol* 231: 19-20

Di Stasio M, Brefort T, Mendoza-Mendoza A, Munch K, Kahmann R (2009) The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 73: 73-88

Doehlemann G, Wahl R, Vranes M, de Vries RP, Kamper J, Kahmann R (2008) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* 165: 29-40

Drees BL, Sundin B, Brazeau E, Caviston JP, Chen GC, Guo W, Kozminski KG, Lau MW, Moskowitz JJ, Tong A, Schenkman LR, McKenzie A, 3rd, Brennwald P, Longtine M, Bi E, Chan C, Novick P, Boone C, Pringle JR, Davis TN, Fields S, Drubin DG (2001) A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol* 154: 549-571

Dürrenberger F, Wong K, Kronstad JW (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5684-5689

Erickson JW, Cerione RA (2004) Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry* 43: 837-842

Eva A, Aaronson SA (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 316: 273-275

Feig LA, Cooper GM (1988) Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 8: 3235-3243

Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83: 1037-1046

Finger FP, Hughes TE, Novick P (1998) Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92: 559-571

Frieser SH (2011) Die dynamische Regulation der kleinen GTPase Rac1 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Frieser SH, Hlubek A, Sandrock B, Bölker M (2011) Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 22: 3253-3262

Gao Y, Xing J, Streuli M, Leto TL, Zheng Y (2001) Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 276: 47530-47541

Gillissen B, Bergemann J, Sandmann C, Schroeer B, Bölker M, Kahmann R (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* 68: 647-657

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090

Glomset JA, Farnsworth CC (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* 10: 181-205

Gold S, Duncan G, Barrett K, Kronstad J (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* 8: 2805-2816

Guo W, Grant A, Novick P (1999a) Exo84p is an exocyst protein essential for secretion. *J Biol Chem* 274: 23558-23564

Guo W, Roth D, Walch-Solimena C, Novick P (1999b) The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J* 18: 1071-1080

Guo W, Tamanoi F, Novick P (2001) Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol* 3: 353-360

Hamel B, Monaghan-Benson E, Rojas RJ, Temple BR, Marston DJ, Burrridge K, Sondek J (2011) SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC. *J Biol Chem* 286: 12141-12148

Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204: 63-113

Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354: 311-314

Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA, Zheng Y (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem* 269: 62-65

Hartman HL, Hicks KA, Fierke CA (2005) Peptide specificity of protein prenyltransferases is determined mainly by reactivity rather than binding affinity. *Biochemistry* 44: 15314-15324

Hartmann HA, Kahmann R, Bolker M (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 15: 1632-1641

Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M (1996) DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol* 16: 1770-1776

Hauser AD, Bergom C, Schuld NJ, Chen X, Lorimer EL, Huang J, Mackinnon AC, Williams CL (2014) The SmgGDS splice variant SmgGDS-558 is a key promoter of tumor growth and RhoA signaling in breast cancer. *Mol Cancer Res* 12: 130-142

He B, Guo W (2009) The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 21: 537-542

He B, Xi F, Zhang J, TerBush D, Zhang X, Guo W (2007a) Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *J Cell Biol* 176: 771-777

He B, Xi F, Zhang X, Zhang J, Guo W (2007b) Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J* 26: 4053-4065

Hertzog M, Chavrier P (2011) Cell polarity during motile processes: keeping on track with the exocyst complex. *Biochem J* 433: 403-409

Hirano H, Tanaka K, Ozaki K, Imamura H, Kohno H, Hihara T, Kameyama T, Hotta K, Arisawa M, Watanabe T, Qadota H, Ohya Y, Takai Y (1996) ROM7/BEM4 encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 4396-4403

Hiraoka K, Kaibuchi K, Ando S, Musha T, Takaishi K, Mizuno T, Asada M, Menard L, Tomhave E, Didsbury J, et al. (1992) Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 921-930

Hlubek A (2008) Die selektive Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren bestimmt deren Signalspezifität in *Ustilago maydis*. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Hlubek A, Schink KO, Mahlert M, Sandrock B, Bölker M (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 68: 615-623

Hutchinson JP, Rittinger K, Eccleston JF (2000) Purification and characterization of guanine nucleotide dissociation stimulator protein. *Methods Enzymol* 325: 71-82

Isomura M, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura S, Katayama M, Takai Y (1990) Partial purification and characterization of GDP dissociation stimulator (GDS) for the rho proteins from bovine brain cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 652-659

Jack ER, Madine J, Lian LY, Middleton DA (2008) Membrane interactions of peptides representing the polybasic regions of three Rho GTPases are sensitive to the distribution of arginine and lysine residues. *Mol Membr Biol* 25: 14-22

Jaeger ME (2011) Funktion des Exozyst-Proteins Sec15 und der Rab-GTPase Sec4 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*. *Bachelorarbeit, Philipps Universität Marburg*

Jin Y, Sultana A, Gandhi P, Franklin E, Hamamoto S, Khan AR, Munson M, Schekman R, Weisman LS (2011) Myosin V transports secretory vesicles via a Rab GTPase cascade and interaction with the exocyst complex. *Dev Cell* 21: 1156-1170

Kaffarnik F, Müller P, Leibundgut M, Kahmann R, Feldbrügge M (2003) PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 22: 5817-5826

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkotter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97-101

Kämper J, Reichmann M, Romeis T, Bölker M, Kahmann R (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* 81: 73-83

Karnoub AE, Worthylake DK, Rossman KL, Pruitt WM, Campbell SL, Sondek J, Der CJ (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol* 8: 1037-1041

Karunanithi S, Cullen PJ (2012) The filamentous growth MAPK Pathway Responds to Glucose Starvation Through the Mig1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192: 869-887

Kim E, Ambroziak P, Otto JC, Taylor B, Ashby M, Shannon K, Casey PJ, Young SG (1999) Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *J Biol Chem* 274: 8383-8390

Klosterman SJ, Martinez-Espinoza AD, Andrews DL, Seay JR, Gold SE (2008) Ubc2, an ortholog of the yeast Ste50p adaptor, possesses a basidiomycete-specific carboxy terminal extension essential for pathogenicity independent of pheromone response. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 110-121

König J, Baumann S, Koepke J, Pohlmann T, Zarnack K, Feldbrügge M (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J* 28: 1855-1866

Krüger J, Loubradou G, Regenfelder E, Hartmann A, Kahmann R (1998) Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* 260: 193-198

Lanning CC, Ruiz-Velasco R, Williams CL (2003) Novel mechanism of the co-regulation of nuclear transport of SmgGDS and Rac1. *J Biol Chem* 278: 12495-12506

Lanver D (2011) Appressorienbildung von *Ustilago maydis* auf hydrophoben Oberflächen:

Regulation durch Membranproteine. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Lanver D, Mendoza-Mendoza A, Brachmann A, Kahmann R (2010) Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 22: 2085-2101

Lechler T, Jonsdottir GA, Klee SK, Pellman D, Li R (2001) A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *J Cell Biol* 155: 261-270

Lee N, Kronstad JW (2002) ras2 Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* 1: 954-966

Lehmle C, Steinberg G, Snetselaar KM, Schliwa M, Kahmann R, Bolker M (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 16: 3464-3473

Leveleki L, Mahlert M, Sandrock B, Bölker M (2004) The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 54: 396-406

Lipschutz JH, Mostov KE (2002) Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* 12: R212-214

Liu J, Guo W (2012) The exocyst complex in exocytosis and cell migration. *Protoplasma* 249: 587-597

Liu J, Zuo X, Yue P, Guo W (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 18: 4483-4492

Lorenz MC, Cutler NS, Heitman J (2000) Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 183-199

Mack D, Nishimura K, Dennehey BK, Arbogast T, Parkinson J, Toh-e A, Pringle JR, Bender A, Matsui Y (1996) Identification of the bud emergence gene BEM4 and its interactions with rho-type GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 4387-4395

Mahlert M (2006) Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*:

Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Mahlert M, Leveleki L, Hlubek A, Sandrock B, Bölker M (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 59: 567-578

Martin-Cuadrado AB, Morrell JL, Konomi M, An H, Petit C, Osumi M, Balasubramanian M, Gould KL, Del Rey F, de Aldana CR (2005) Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 16: 4867-4881

Mayorga ME, Gold SE (2001) The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol* 41: 1365-1379

Mendoza-Mendoza A, Berndt P, Djamei A, Weise C, Linne U, Marahiel M, Vranes M, Kamper J, Kahmann R (2009) Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 71: 895-911

Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152: 111-126

Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247: 939-945

Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y, Takai Y (1991) A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6442-6446

Morgera F, Sallah MR, Dubuke ML, Gandhi P, Brewer DN, Carr CM, Munson M (2012) Regulation of exocytosis by the exocyst subunit Sec6 and the SM protein Sec1. *Mol Biol Cell* 23: 337-346

Mösch HU, Roberts RL, Fink GR (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5352-5356

Müller P, Katzenberger JD, Loubradou G, Kahmann R (2003a) Guanyl nucleotide exchange factor Sql2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* 2: 609-617

Müller P, Weinzierl G, Brachmann A, Feldbrügge M, Kahmann R (2003b) Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* 2: 1187-1199

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273

Munson M, Novick P (2006) The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat Struct Mol Biol* 13: 577-581

Neal SE, Eccleston JF, Webb MR (1990) Hydrolysis of GTP by p21NRAS, the NRAS protooncogene product, is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: use of a single fluorescent probe at the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3562-3565

Nern A, Arkowitz RA (2000) Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J Cell Biol* 148: 1115-1122

Osman MA, Konopka JB, Cerione RA (2002) Iqg1p links spatial and secretion landmarks to polarity and cytokinesis. *J Cell Biol* 159: 601-611

Peifer M, Berg S, Reynolds AB (1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76: 789-791

Pham CD, Perlin MH (2010) Possible additional roles in mating for *Ustilago maydis* Rho1 and 14-3-3 homologues. *Commun Integr Biol* 3: 57-59

Pham CD, Yu Z, Sandrock B, Bölker M, Gold SE, Perlin MH (2009) *Ustilago maydis* Rho1 and 14-3-3 homologues participate in pathways controlling cell separation and cell polarity. *Eukaryot Cell* 8: 977-989

Pruyne DW, Schott DH, Bretscher A (1998) Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J Cell Biol* 143: 1931-1945

Regenfelder E, Spellig T, Hartmann A, Lauenstein S, Bolker M, Kahmann R (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J* 16: 1934-1942

Riggleman B, Wieschaus E, Schedl P (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev* 3: 96-113

Rittmeyer EN, Daniel S, Hsu SC, Osman MA (2008) A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. *J Cell Sci* 121: 391-403

Robinson NG, Guo L, Imai J, Toh EA, Matsui Y, Tamanoi F (1999) Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol Cell Biol* 19: 3580-3587

Ron D, Graziani G, Aaronson SA, Eva A (1989) The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity. *Oncogene* 4: 1067-1072

Ron D, Zannini M, Lewis M, Wickner RB, Hunt LT, Graziani G, Tronick SR, Aaronson SA, Eva A (1991) A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol* 3: 372-379

Rossman KL, Der CJ, Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 167-180

Salazar MA, Kwiatkowski AV, Pellegrini L, Cestra G, Butler MH, Rossman KL, Serna DM, Sondek J, Gertler FB, De Camilli P (2003) Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278: 49031-49043

Salminen A, Novick PJ (1989) The Sec15 protein responds to the function of the GTP binding protein, Sec4, to control vesicular traffic in yeast. *J Cell Biol* 109: 1023-1036

Sasaki T, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Isomura M, Kuroda S, Takai Y (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* 265: 2333-2337

Schink KO (2010) Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis*. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Schink KO, Bölker M (2009) Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 20: 1081-1088

Schirawski J, Bohnert HU, Steinberg G, Snetselaar K, Adamikowa L, Kahmann R (2005) Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 17: 3532-3543

Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16: 1587-1609

5. Literaturverzeichnis

Schuld NJ, Hauser AD, Gastonguay AJ, Wilson JM, Lorimer EL, Williams CL (2014a) SmgGDS-558 regulates the cell cycle in pancreatic, non-small cell lung, and breast cancers. *Cell Cycle* 13: 941-952

Schuld NJ, Vervacke JS, Lorimer EL, Simon NC, Hauser AD, Barbieri JT, Distefano MD, Williams CL (2014b) The chaperone protein SmgGDS interacts with small GTPases entering the prenylation pathway by recognizing the last amino acid in the CAAX motif. *J Biol Chem* 289: 6862-6876

Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schafer W, Martin T, Herskowitz I, Kahmann R (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60: 295-306

Seabra MC, Wasmeier C (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 451-457

Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063

Shimada Y, Gulli MP, Peter M (2000) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2: 117-124

Shin EY, Lee CS, Cho TG, Kim YG, Song S, Juhn YS, Park SC, Manser E, Kim EG (2006) betaPak-interacting exchange factor-mediated Rac1 activation requires smgGDS guanine nucleotide exchange factor in basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 281: 35954-35964

Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27

Sivaram MV, Saporita JA, Furgason ML, Boettcher AJ, Munson M (2005) Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry* 44: 6302-6311

Snetselaar KM, Bölker M, Kahmann R (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* 20: 299-312

Snyder JT, Rossman KL, Baumeister MA, Pruitt WM, Siderovski DP, Der CJ, Lemmon MA, Sondek J (2001) Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. *J Biol Chem* 276: 45868-45875

Songer JA, Munson M (2009) Sec6p anchors the assembled exocyst complex at sites of secretion. *Mol Biol Cell* 20: 973-982

Southern EM (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology* 24: 122-139

Spellig T, Bölker M, Lottspeich F, Frank RW, Kahmann R (1994a) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 13: 1620-1627

Spellig T, Regenfelder E, Reichmann M, Schauwecker F, Bohlmann R, Urban M, Bölker M, Kämper J, Kahmann R (1994b) Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65: 191-197

Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 513-525

Stewart A, Deacon JW (1995) Vital fluorochromes as tracers for fungal growth studies. *Biotech Histochem* 70: 57-65

Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272: 23371-23375

Takai S, Hasegawa H, Kiyokawa E, Yamada K, Kurata T, Matsuda M (1996) Chromosomal mapping of the gene encoding DOCK180, a major Crk-binding protein, to 10q26.13-q26.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 35: 403-404

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208

TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15: 6483-6494

TerBush DR, Novick P (1995) Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 130: 299-312

Tesfaigzi J, Smith-Harrison W, Carlson DM (1994) A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* 17: 268-269

Tew GW, Lorimer EL, Berg TJ, Zhi H, Li R, Williams CL (2008) SmgGDS regulates cell proliferation, migration, and NF-kappaB transcriptional activity in non-small cell lung carcinoma. *J Biol Chem* 283: 963-976

Tewari R, Bailes E, Bunting KA, Coates JC (2010) Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol* 20: 470-481

Tillmann BAM (2013) Mechanismen der Erkennung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren in *U. maydis*. *Dissertation, Philipps Universität Marburg*

Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30: 4637-4648

Vetter IR, Wittinghofer A (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299-1304

Vikis HG, Stewart S, Guan KL (2002) SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms. *Oncogene* 21: 2425-2432

Wedlich-Söldner R, Altschuler S, Wu L, Li R (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science* 299: 1231-1235

Wedlich-Söldner R, Straube A, Friedrich MW, Steinberg G (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* 21: 2946-2957

Wehr M (2008) Untersuchung der Exocyst-Komponente Sec3 in *Ustilago maydis*. *Bachelorarbeit, Philipps Universität Marburg*

Wehr M (2010) Das Gerüstprotein Iqg1 spielt eine essentielle Rolle bei der Zellteilung und der Pathogenität in *Ustilago maydis*. *Masterarbeit, Philipps Universität Marburg*

Weinzierl G, Leveleki L, Hassel A, Kost G, Wanner G, Bölker M (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 45: 219-231

West M, Kung HF, Kamata T (1990) A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins. *FEBS Lett* 259: 245-248

White TJ, Arnheim N, Erlich HA (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet* 5: 185-189

Wiederkehr A, Du Y, Pypaert M, Ferro-Novick S, Novick P (2003) Sec3p is needed for the spatial regulation of secretion and for the inheritance of the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14: 4770-4782

Williams CL (2003) The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal* 15: 1071-1080

Wu C, Lee SF, Furmaniak-Kazmierczak E, Cote GP, Thomas DY, Leberer E (1996a) Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J Biol Chem* 271: 31787-31790

Wu C, Lytvyn V, Thomas DY, Leberer E (1997a) The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J Biol Chem* 272: 30623-30626

Wu H, Rossi G, Brennwald P (2008) The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends Cell Biol* 18: 397-404

Wu H, Turner C, Gardner J, Temple B, Brennwald P (2010) The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Mol Biol Cell* 21: 430-442

Wu SK, Zeng K, Wilson IA, Balch WE (1996b) Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem Sci* 21: 472-476

Wu WJ, Leonard DA, R AC, Manor D (1997b) Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J Biol Chem* 272: 26153-26158

Yaku H, Sasaki T, Takai Y (1994) The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties in comparison with those of Smg GDS. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 811-817

Yamamoto T, Kaibuchi K, Mizuno T, Hiroyoshi M, Shirataki H, Takai Y (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of proteins that regulate

the GDP/GTP exchange reaction of smg p21s, ras p21-like GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 265: 16626-16634

Yamashita M, Kurokawa K, Sato Y, Yamagata A, Mimura H, Yoshikawa A, Sato K, Nakano A, Fukai S (2010) Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3. *Nat Struct Mol Biol* 17: 180-186

Yee AR, Kronstad JW (1993) Construction of chimeric alleles with altered specificity at the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 664-668

Yokoyama K, Goodwin GW, Ghomashchi F, Glomset JA, Gelb MH (1991) A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5302-5306

Zarnack K, Eichhorn H, Kahmann R, Feldbrugge M (2008) Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* 69: 1041-1053

Zhang FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65: 241-269

Zhang X, Bi E, Novick P, Du L, Kozminski KG, Lipschutz JH, Guo W (2001) Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem* 276: 46745-46750

Zhang X, Orlando K, He B, Xi F, Zhang J, Zajac A, Guo W (2008) Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol* 180: 145-158

Zhang X, Zajac A, Zhang J, Wang P, Li M, Murray J, TerBush D, Guo W (2005) The critical role of Exo84p in the organization and polarized localization of the exocyst complex. *J Biol Chem* 280: 20356-20364

Zhi H, Yang XJ, Kuhnmuensch J, Berg T, Thill R, Yang H, See WA, Becker CG, Williams CL, Li R (2009) SmgGDS is up-regulated in prostate carcinoma and promotes tumour phenotypes in prostate cancer cells. *J Pathol* 217: 389-397

Ziman M, O'Brien JM, Ouellette LA, Church WR, Johnson DI (1991) Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol* 11: 3537-3544

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ARM	Armadillo Wiederholungen
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	„ <i>bovine serum albumin</i> “
bzw.	beziehungsweise
cAMP	„ <i>cyclic adenosine monophosphate</i> “
Cbx	Carboxin
CM	„ <i>complete medium</i> “
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DH	Dbl-Homologie
DIC	„ <i>differential interference contrast</i> “
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dYT	„ <i>double yeast tryptone</i> “
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	„ <i>et alteres</i> “
FG	„ <i>filamentous growth</i> “
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-Hpdiethylaminophenylhexatrienyl)pyridiniumdibromid
GAP	GTPase-aktivierendes-Protein
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziation-Inhibitor
GDP	Guanindiphosphat
GDS	Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Stimulator
GEF	GTPase-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)

Abkürzungen

GTP	Guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
Hyg	Hygromycin
ip	„ <i>iron-sulphur protein</i> “
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
m	mili
M	molar
mantGDP	2'(3')-O-(N-Methylantraniloyl)-GDP
MAPKKK	Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Kinase-Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
μ	micro
n	nano
NAT	Nourseothricin
N-Terminus	Amino-Terminus
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	„ <i>open reading frame</i> “
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAK	p21 aktivierten Kinase
PH	Pleckstrin Homologie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	„ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
UV	Ultraviolett

Abkürzungen

WT	Wildtyp
YEP	„ <i>yeast extract + peptone</i> “
YEPS	„ <i>yeast extract + peptone + sucrose</i> “
YNB	„ <i>yeast nitrogne base</i> “
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Bölker für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen und für seine stets hilfreiche Unterstützung.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. Susanne Önel für die kurzfristige Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Zudem bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Martin Thanbichler und Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes und der Arbeit.

Bei allen Mitgliedern und Ehemaligen der AG Bölker bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die wunderbare Teamarbeit und viele schöne Kaffeepausen.

Alex, Alina, Annette, Beate, Britta, Christian R., Christopher, Darius, Elaine, Esme, Flo, Johannes, Julia, Kay, Stefan, Sonja, Thorsten, Tine und Tobi danke ich für die vielen schönen Momente außerhalb des Labors, in denen wir zusammen gelacht, getrunken, gegessen, getanzt, gefeiert und Filme angeschaut haben.

Björn gilt mein Dank für die vielen Anregungen, praktischen Unterstützungen und nicht zu letzt, für das Erlebnis eine Nacht in Paris auf den Flughafen zu verbringen. Die Zeit in Mexiko bei der Usti-Konferenz war sehr schön.

Britta möchte ich besonders für die vielen Gespräche, Essen, Telefonate, den schönen Urlaub in Kalifornien und die ständige Unterstützung danken.

Meine „Assi-Ost-Conection“ Kollegin und Mitstreiterin Julia danke ich für die vielen schönen Weinabende, See-Besuche, Spielabende und zuletzt die tatkräftige Unterstützung beim Streichen und Möbel schleppen.

I thank Esme for so many presents from her holidays and also for very nice conversations, shopping tours and especially that I was forced to improve my English.

Danksagung

Marisa bin ich für ihre technische und organisatorische Unterstützung dankbar. Ohne sie wäre ein reibungsloses Arbeiten im Labor nicht möglich gewesen. Mir werden auch ihre leckeren Kuchen und die vielen Gespräche in der Kaffeeküche fehlen.

Für die schönen Blumensträuße jedes Jahr zum Geburtstag danke ich Silke, waren sie doch gleichzeitig auch immer eine gute Erinnerungshilfe, dass ein Geburtstag anstand.

Birgit und Hanne möchte ich für ihre Fürsorge und die Organisationen neben dem Laborleben Danke sagen.

Ein ganz großer Dank gilt auch Christian R., der seit meinem Bachelorstudiums ein treuer Weggefährte ist. Egal viel er gerade zu tun hatte, er hat sich immer Zeit für die kleinen und großen Probleme genommen und mir somit des Öfteren aus der Klemme geholfen. Seien es Fragen zur Mikroskopie oder zu Computern, er hatte immer ein offenes Ohr. DANKE!

Marco danke ich zum einen für die vielen Fahrten in Richtung Heimat, durch die meine Oma so manches Mal zur Seite springen musste; aber auch für die viele Hilfe bezüglich der HPLC und besonders meinen kleinen Computerproblemen.

Bei allen Mitgliedern der AG Möschi möchte ich mich für die lustige Zeit in der Kaffeeküche bedanken.

Mein Dank gilt meinem Freundeskreis und besonders Sabine, die mich die meiste Zeit ertragen musste; mir immer wieder Mut gemacht hat; mit mir unzählige Wein- und Dönerabende verbracht hat und für jede noch so extreme Ablenkung zu haben war.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Hagen, der mich immer lecker bekocht, die besten Torten gebacken, meine Launen ertragen, mich frühs aus dem Bett geschmissen hat und zu guter letzt die grammatikalischen Fehler in dieser Arbeit beseitigt hat. Mit seiner Ausgeglichenheit konnte er mich immer wieder beruhigen und mir viele Sachen aus einer anderen Perspektive zeigen.

Der größte DANK gilt meiner Familie, die mich all die Jahre unterstützt haben, immer von mir überzeugt waren und mich mit Motivationspaketen überrascht haben ☺.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michaela Wehr, geboren am 15.04.1987 in Heilbad Heiligenstadt, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel: „Untersuchung der Regulierung kleiner GTPasen während des filamentösen Wachstums und der Sekretion in *U. maydis*“ selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetztigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg den 05.08.2014

M. Wehr